

Université de Montréal

**Formulations thermosensibles à base de chitosan  
pour la libération prolongée de médicaments**

Par

Eve Ruel-Gariépy

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade Philosophiae Doctor (Ph. D.)  
en sciences pharmaceutiques  
option technologie pharmaceutique

Avril, 2004

© Eve Ruel-Gariépy, 2004



QV

705

U58

2005

V.002

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée  
Formulations thermosensibles à base de chitosan pour la libération prolongée de  
médicaments

présentée par  
Eve Ruel-Gariépy

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Albert Adam, président-rapporteur  
Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche  
Maxime Ranger, membre du jury  
Julianna Juhasz, examinateur externe  
, représentant du doyen de la FES



## Résumé

Les formulations pharmaceutiques thermosensibles sont des systèmes liquides à la température ambiante qui se solidifient à 37°C. Elles peuvent donc être administrées par injection au niveau intra-musculaire ou sous-cutané et forment un dépôt *in situ*. Ces formulations sont présentement étudiées pour la mise au point de formes pharmaceutiques à libération prolongée. Récemment, un hydrogel à base de chitosan a été mis au point. Le principal but de ce projet était de caractériser ce nouveau système thermosensible et d'étudier les possibilités d'utilisation de celui-ci en tant que véhicule pour la libération prolongée de médicaments.

Les études de caractérisation physico-chimique ont montré que la cinétique de gélification à 37°C et la stabilité de la solution variaient en fonction du degré de désacétylation du chitosan utilisé alors que l'érosion du gel formé à 37°C en était indépendante. Ces études ont également révélé que le système à l'état liquide était stable au moins 2 mois à la température ambiante et à 4°C. Les macromolécules hydrophiles incorporées dans le gel ont été libérées sur une période de quelques jours *in vitro*. L'hydrogel ne permettait cependant pas de soutenir la libération des petites molécules hydrophiles plus de 24 heures, dans des conditions similaires.

Afin de prolonger le temps de libération des petites molécules hydrophiles, ces dernières ont été encapsulées dans des liposomes avant d'être incorporées dans la solution thermosensible. L'ajout des liposomes n'a pas eu d'impact majeur sur la cinétique de gélification de la solution thermosensible à 37°C selon les études de rhéologie. Par contre, la durée de la libération des petites molécules hydrophiles a été augmentée significativement par cette modification du système et la vitesse de libération pouvait être modulée en variant la taille et la composition des liposomes.

Par la suite, le potentiel du système liposome/solution thermosensible en tant que matrice pour la libération prolongée de peptides thérapeutiques a été évalué en utilisant l'hexaréline, un peptide de faible poids moléculaire, comme molécule modèle. L'hexaréline est un sécrétagogue de l'hormone de croissance. L'injection sous-cutanée de la formulation n'a pas permis d'obtenir des taux plasmatiques décelables d'hexaréline au-delà de 24 heures lors des études *in vivo*.

L'utilisation de la solution thermosensible à base de chitosan pour une thérapie locale a alors été envisagée. L'application choisie a été l'administration d'agents anti-néoplasiques au site de résection d'une tumeur primaire afin de prévenir la croissance des cellules cancéreuses résiduelles. Les études de libération *in vitro* ont montré que l'hydrogel pouvait soutenir la libération du paclitaxel, un agent anti-néoplasique utilisé principalement dans les cas de cancer du sein et des ovaires, pendant au moins 1 mois et que sa vitesse de libération (% libéré) était inversement proportionnelle à sa concentration dans le gel. Des études avec des souris Balb/c porteuses de tumeurs EMT-6 (carcinome mammaire murin) ont démontré que la formulation thermosensible injectée par la voie intra-tumorale était aussi efficace que l'administration intra-veineuse de paclitaxel sous sa forme présentement disponible sur le marché (Taxol®) en utilisant une régime posologique plus simple (1 vs 4 injections). De plus, les animaux traités localement n'ont présenté aucun effet secondaire systémique alors que ceux ayant reçu le traitement par la voie intra-veineuse ont présenté une perte de poids.

Ce travail a montré que la solution thermosensible à base de chitosan offre plusieurs possibilités en tant que véhicule pour la libération de médicaments. La nature du composé incorporé ainsi que l'utilisation ou non de liposomes étant les critères régissant de façon marquée le profil de libération.

**Mots-clés:** hydrogel, thermosensible, chitosan, libération prolongée, liposomes.

## Abstract

Thermosensitive pharmaceutical formulations are delivery systems that are liquid at room temperature and turn solid at 37°C. They can be administered through a needle in the intra-muscular or subcutaneous space and form an implant *in situ*. These formulations are currently studied as sustained release dosage forms. Recently, a chitosan-based hydrogel was developed. The main goal of the project was to characterize this new thermosensitive system and evaluate its potential as a sustained drug delivery vehicle.

The characterization studies showed that the gelation kinetics at 37°C and the stability of the solutions varied according to the deacetylation degree of the chitosan used whereas gel erosion was not affected by this property. These studies also revealed that the solutions (before gelation) could be kept at least 2 months at room temperature or at 4°C. *In vitro*, hydrophilic macromolecules were released from the gel over a period of a few days. However, the gel could not sustain the release of low molecular weight hydrophilic compounds for more than 24 hours, under similar conditions.

In order to obtain a sustained release with low molecular weight hydrophilic compounds, they were encapsulated into liposomes before being incorporated in the thermosensitive solution. The addition of liposomes only slightly influenced the gelation kinetics of the thermosensitive solution at 37°C. Nevertheless, encapsulation into liposomes significantly slowed down release from the hydrogel and the release rate could be controlled by adjusting liposome characteristics, such as size and composition.

Then, the potential of the liposome/thermosensitive solution formulation for the sustained delivery of therapeutic peptides was evaluated using hexareline, a small molecular weight peptide, as model drug. Hexareline is a growth hormone secretagogue. The *in vivo* studies revealed that the subcutaneous administration of the new system could not provide detectable plasmatic concentrations of hexareline beyond 24 hours.

A local application using the thermosensitive solution was hence tested. We proposed to use the formulation for the delivery of antineoplastic agents at tumor resection sites in order to prevent the growth of residual cancer cells. The *in vitro* release studies showed that the hydrogel could sustain the release of paclitaxel, an antineoplastic agent used in breast and ovarian cancer, over at least 1 month. The initial drug loading affected the release rate, the latter (% released) being reduced at higher drug loading. *In vivo* studies using Balb/c mice bearing EMT-6 tumors (murine carcinoma) revealed that the intratumoral injection of the thermosensitive formulation was as efficacious as the intravenous administration of the commercial product Taxol<sup>®</sup> while using a more convenient administration regimen (1 vs 4 injections). Moreover, the animals treated locally showed no apparent drug-related adverse effects of treatment, whereas the systemic treatment group showed weight loss.

This work showed that the chitosan-based thermosensitive solution offers many possibilities as a vehicle for drug delivery. The incorporated compound characteristics as well as the choice to use liposomes or not being the main factors controlling the release profile.

**Keywords:** hydrogel, thermosensitive, chitosan, sustained release, liposomes.



1.3.4	Conservation des aliments .....	34
1.3.5	Applications biomédicales .....	35
1.3.5.1	Effet au niveau sanguin .....	36
1.3.5.2	Traitement des plaies .....	37
1.3.5.3	Réparation tissulaire .....	39
1.3.5.4	Effet sur les lipides circulants .....	41
1.3.5.5	Effet sur les tumeurs .....	41
1.3.5.6	Administration des médicaments .....	42
1.4	But du projet .....	44
1.5	Produits et méthodes .....	45
1.5.1	Produits .....	45
1.5.2	Préparation de la solution thermosensible .....	46
1.5.3	Préparation des liposomes .....	46
1.5.4	Rhéologie .....	47
1.5.5	Stabilité des solutions thermosensibles .....	47
1.5.6	Études de libération <i>in vitro</i> .....	48
1.5.7	Érosion .....	49
1.5.8	Microscopie électronique à balayage .....	49
1.5.9	Activité anti-tumorale <i>in vivo</i> .....	50
1.6	Bibliographie .....	52
2	In situ-forming hydrogels – Review of temperature-sensitive systems .....	71
2.1	Abstract .....	71
2.2	Table of contents .....	72
2.3	Introduction .....	73
2.4	Polysaccharides .....	78
2.4.1	Cellulose derivatives .....	78
2.4.2	Xyloglucan .....	80
2.4.3	Chitosan and glycerophosphate .....	81
2.5	<i>N</i> -isopropylacrylamide copolymers .....	85
2.5.1	Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide-co-acrylic acid) .....	85
2.5.2	Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide) / poly(ethylene oxide) .....	89
2.6	Poloxamer systems .....	90
2.6.1	Poloxamer (Pluronic®) .....	90

2.6.2	Poloxamer / poly(acrylic acid).....	94
2.7	Poly(ethylene oxide) / poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid).....	96
2.8	Thermosensitive liposomes as a physical barrier between reactive species .....	100
2.9	Miscellaneous .....	103
2.9.1	Poly(organophosphazene) derivatives.....	103
2.9.2	Poly(1,2-propylene phosphate).....	103
2.10	Conclusion.....	104
2.11	References .....	105
3	Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs.....	118
3.1	Abstract .....	118
3.2	Introduction .....	119
3.3	Materials and methods .....	121
3.3.1	Materials .....	121
3.3.2	Preparation of the chitosan/glycerophosphate solution (C/GP solution) .....	122
3.3.3	Rheological measurements .....	122
3.3.4	Stability of C/GP solutions .....	123
3.3.5	<i>In vitro</i> release studies .....	123
3.3.6	Mass loss.....	123
3.3.7	Scanning electron microscopy (SEM).....	124
3.3.8	Statistical analysis .....	124
3.4	Results .....	125
3.4.1	Rheological measurements .....	125
3.4.2	Stability of C/GP solutions .....	126
3.4.3	<i>In vitro</i> release studies .....	128
3.4.4	Mass loss.....	132
3.4.5	Scanning electron microscopy .....	133
3.5	Discussion.....	134
3.6	References .....	138
4	Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules.....	143
4.1	Abstract .....	143

4.2	Introduction .....	144
4.3	Materials and methods .....	147
4.3.1	Materials .....	147
4.3.2	Preparation of the liposomes.....	147
4.3.3	Preparation of the chitosan/glycerophosphate (C/GP) solution.	148
4.3.4	Rheological measurements .....	148
4.3.5	Freeze-fracture electron microscopy .....	149
4.3.6	<i>In vitro</i> release studies .....	149
4.3.7	Mathematical modeling .....	150
4.4	Results .....	152
4.4.1	Rheological measurements .....	152
4.4.2	<i>In vitro</i> release studies .....	154
4.5	Discussion.....	162
4.6	Conclusion.....	167
4.7	References .....	168
5	Gels d'hexaréline .....	174
5.1	Introduction .....	174
5.2	Produits et méthodes.....	179
5.2.1	Produits.....	179
5.2.2	Préparation des liposomes .....	179
5.2.3	Détermination du taux d'incorporation d'hexaréline dans les liposomes .....	180
5.2.4	Préparation de la solution thermosensible .....	181
5.2.5	Étude de libération <i>in vitro</i> .....	181
5.2.6	Étude pharmacocinétique.....	182
5.3	Résultats .....	183
5.3.1	Optimisation de la taille des liposomes et du taux d'incorporation.. .....	183
5.3.2	Libération <i>in vitro</i> .....	184
5.3.3	Étude pharmacocinétique.....	185
5.4	Discussion.....	187
5.5	Conclusion.....	191
5.6	Bibliographie .....	192



6	A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel.....	198
6.1	Abstract .....	198
6.2	Introduction .....	199
6.3	Materials and methods .....	202
6.3.1	Materials .....	202
6.3.2	Preparation of the chitosan/glycerophosphate (C/GP) solution.....	203
6.3.3	<i>In vitro</i> release studies .....	203
6.3.4	Stability of paclitaxel after $\gamma$ -irradiation.....	204
6.3.5	<i>In vivo</i> anti-tumor activity .....	204
6.3.6	Histology analysis .....	205
6.3.7	Statistical analysis .....	206
6.4	Results .....	206
6.4.1	<i>In vitro</i> release studies.....	206
6.4.2	Stability of paclitaxel after $\gamma$ -irradiation.....	207
6.4.3	<i>In vivo</i> anti-tumor activity .....	209
6.4.4	Histology studies.....	211
6.5	Discussion.....	214
6.6	Conclusion.....	221
6.7	References .....	222
7	Discussion générale .....	228
7.1	Caractérisation du système thermosensible.....	228
7.1.1	Cinétique de gélification.....	228
7.1.2	Stabilité de la solution .....	229
7.1.3	Érosion du gel .....	230
7.1.4	Microscopie électronique à balayage .....	231
7.2	Études de libération <i>in vitro</i> .....	232
7.2.1	Libération de composés hydrophiles.....	232
7.2.1.1	Influence de la présence de glycérophosphate (GP) .....	232
7.2.1.2	Influence de la taille de composés incorporés .....	232
7.2.1.3	Influence du degré de désacétylation du chitosan utilisé.....	233
7.2.1.4	Influence de la charge du composé incorporé.....	234
7.2.1.5	Mécanisme de libération des composés hydrophiles.....	235

7.2.2	Libération d'un composé hydrophile encapsulé dans des liposomes avant incorporation dans la solution thermosensible.....	235
7.2.2.1	Influence des liposomes.....	236
7.2.2.2	Influence de la taille des liposomes.....	236
7.2.2.3	Influence de la lamellarité des liposomes.....	237
7.2.2.4	Influence de la composition des liposomes .....	237
7.2.3	Libération d'un composé hydrophobe .....	239
7.3	Étude <i>in vivo</i> avec l'hexaréline .....	240
7.4	Études <i>in vivo</i> avec le paclitaxel .....	241
7.5	Bibliographie .....	243
8	Conclusion.....	247

## Liste des tableaux

### **Chapitre 2 In situ-forming hydrogels – Review of temperature-sensitive systems**

Tableau 2.1	Poloxamer temperature-sensitive solutions for drug delivery applications: some examples since 1997 .....	92
-------------	--	----

### **Chapitre 3 Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs**

Tableau 3.1	Yield stress (dynes/cm <sup>2</sup> ) of a C84/GP solution as a function of time of storage at 4±0.1°C or room temperature. Each value is a mean ± SEM of three measurements. ....	126
-------------	--	-----

### **Chapitre 4 Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules**

Tableau 4.1	Characteristics of the liposomes used in the release studies and values for the simulations best fitting the experimental release data. ....	154
-------------	--	-----

### **Chapitre 5 Gels d'hexaréline**

Tableau 5.1	Influence de la méthode de préparation des liposomes sur leur diamètre et sur le taux d'incorporation d'hexaréline.....	183
-------------	---	-----

# Liste des figures

## Chapitre 1 Introduction

Figure 1.1	Concentration plasmatique en fonction du temps suite à une administration orale répétée d'une dose fixe de médicament. ....	2
Figure 1.2	Concentration plasmatique en fonction du temps suite à l'administration d'une formulation à libération prolongée.....	4
Figure 1.3	Classification des formes dépôts.....	6
Figure 1.4	Libération <i>in vivo</i> (rat) de leuprolide à partir d'un dépôt de microsphères de PLA après injection sous-cutanée (○) ou intramusculaire (●). Tiré de (27).....	9
Figure 1.5	Temps d'irradiation (UV) nécessaire pour entraîner la gélification du dérivé de chitosan Az-CH-LA. Tiré de (37). ....	11
Figure 1.6	Diagramme de phase du système monooléate de glycérol-eau montrant la phase micellaire inversée ( $L_2$ ), la phase lamellaire ( $L_\alpha$ ), la phase cubique (C) et la phase hexagonale inversée ( $H_{II}$ ). Tiré de (53). ....	14
Figure 1.7	Structure chimique de la gomme gellane (A) et de l'alginate (B).	16
Figure 1.8	Évolution de la pression intra-oculaire chez le lapin après l'administration de nitrate de pilocarpine en solution 2% ( <i>p/v</i> ) (○) ou à l'aide de la formulation d'alginate 1% ( <i>p/v</i> ) (●). Tiré de (59). ....	17
Figure 1.9	Libération <i>in vitro</i> d'ofloxacin à partir d'un système gélifiant <i>in situ</i> en fonction du pH. Tiré de (61). ....	18
Figure 1.10	Concentrations plasmatiques de théophylline après administration chez le lapin d'une solution aqueuse par voie intra-veineuse (losange), d'une solution 1.5% <i>p/p</i> de xyloglucan par voie orale (carré), de sirop Theo-Dur® (triangle) ou de sirop Theo-Dur Dry® (triangle inversé). Tiré de (71). ....	21
Figure 1.11	Transitions de phase et processus de gélification lors de l'augmentation de température d'une solution aqueuse de P(NIPAM- <i>co</i> -AA). Tiré de (74).....	22

- Figure 1.12 Concentration de timolol dans l'humeur aqueuse de lapin après instillation d'une solution aqueuse de timolol (cercle), d'une solution de poloxamer contenant du timolol (carré) et d'une solution de poloxamer/MC contenant du timolol (triangle). Tiré de (90). ..... 24
- Figure 1.13 Taux sanguins d'estradiol après administration intra-vaginale chez la brebis de crème vaginale Estrace® (300 µg estradiol), de suppositoires vaginaux Premarin® (300 µg d'oestrogènes conjugués) et du Smart Hydrogel™ contenant 60 µg d'estradiol. Tiré de (101). ..... 25
- Figure 1.14 Réticulation de l'alginate à l'aide de liposomes thermosensibles. 28
- Figure 1.15 Gélification (augmentation du module élastique G') de la solution TGase/fibrinogène/liposomes thermosensibles contenant du calcium en fonction de la température. Tiré de (113). ..... 28
- Figure 1.16 Structure chimique de la chitine et du chitosan. .... 30
- Figure 1.17 Préparation du chitosan à partir de la chitine. Tiré de (117). ..... 31
- Figure 1.18 Suspension de kaolinite avant la floculation (gauche) et pendant la floculation (droite). Tiré de (119). ..... 33
- Figure 1.19 Adhésion plaquettaire en fonction de la concentration de chitosan et du temps de contact. Tiré de (138) . ..... 36
- Figure 1.20 Colonies (CFU) de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues après biopsie d'une plaie infectée (rat) traitée ou non avec un pansement à base de chitosan contenant de la sulfadiazine d'argent. Tiré de (146). ..... 38
- Figure 1.21 Une région de peau (2.5 x 2.5-cm<sup>2</sup>) a été retirée puis un lambeau a été découpé (A). Ce dernier était bien vascularisé (B) et il a été positionné au dessus de la plaie (C). Les bords ont été cousus et la peau préparée *in vitro* a été greffée sur la plaie laissée par le lambeau (D). Tiré de (149). ..... 40
- Figure 1.22 Effet hypoglycémique de diverses formulations d'insuline après administration orale chez des rats diabétiques. Solution saline (losange), solution d'insuline-chitosan (triangle), solution

	d'insuline (carré) ou nanoparticules d'insuline enrobées de chitosan (croix) . Tiré de (169). ....	42
Figure 1.23	Cellule de libération à flux continu. Adapté de (188). ....	49

## Chapitre 2 **In situ-forming hydrogels – Review of temperature-sensitive systems**

Figure 2.1	Chemical formulas of hydrogel-forming polymers.....	77
Figure 2.2	<i>In vitro</i> cumulative release of carboxyfluorescein, free (triangles) or encapsulated in 100- (circles) or 280-nm (squares) egg phosphatidylcholine/cholesterol liposomes, from the chitosan/GP gel in PBS at 37°C. Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). The solid lines represent the simulated release kinetics. Reprinted with permission from ref. (42). ....	83
Figure 2.3	<i>In vivo</i> antitumor effect in Balb/c mice bearing an EMT-6 tumor. Saline 0.2 mL/day intravenous x 4 days (closed circles, n=8), Taxol® 10 mg/kg/day intravenous x 4 days (open circles, n=8), chitosan/GP solution 10 $\mu$ L intratumoral (closed squares, n = 8) and paclitaxel/chitosan/GP solution (64 mg/mL paclitaxel) 10 $\mu$ L (40 mg/kg paclitaxel) intratumoral (open squares, n = 8). Reprinted with permission from ref. (43). ....	83
Figure 2.4	Phase transitions (A) and viscosity (flow time through a Cannon-Fenske viscometer) of an aqueous solution of P(NIPAM-co-AA) as a function of temperature. Adapted with permission from ref. (52). ....	87
Figure 2.5	Schematic diagram illustrating the concept for a refillable cell delivery system with a thermally reversible extracellular matrix. Reprinted with permission from ref. (54). ....	88
Figure 2.6	Timolol concentration in aqueous humor after instillation of timolol aqueous solution (circles), timolol-poloxamer solution (squares) and timolol-poloxamer-methylcellulose solution (triangles). Reprinted with permission from ref. (83). ....	91

Figure 2.7	Phase diagram for aqueous solutions of poloxamer-g-PAA at pH 7.0. $T_{gel}$ and $cmt$ stand for the gel point and critical micellization temperature determined by the Winter-Chambon method and DSC, respectively. Reprinted with permission from ref. (102). .. 95
Figure 2.8	Plasma insulin levels of Sprague-Dawley rat after subcutaneous injection of the insulin/ReGel <sup>®</sup> formulation. Reprinted with permission from ref. (121). .... 99
Figure 2.9	(A) Schematic illustration of thermally triggered alginate cross-linking. Adapted with permission from ref. 122. (B) Thermally-triggered gelation of TGase/fibrinogen/thermally-sensitive, calcium-loaded liposome precursor fluid. Reprinted with permission from ref. (123). .... 102

### **Chapitre 3 Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs**

Figure 3.1	Elastic modulus as a function of time at $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ for two different C/GP solutions. The frequency of oscillation is 1 Hz and the acquisition rate is 1 point every 13 seconds. .... 125
Figure 3.2	Viscosity at $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ as a function of shear rate for a C84/GP solution depending on the time of storage at $4^\circ\text{C}$ (A) or room temperature (B). After 1 day (●), 7 days (○), 30 days (■), 60 days (□) and 90 days (▲). Each point represents the mean value $\pm$ SEM from three measurements. .... 127
Figure 3.3	Chlorpheniramine maleate release profile from a medium molecular weight chitosan solution with (●) or without (■) GP in PBS at pH 7.4 and $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . In each experiment, the loading was 3%. Each point represents the mean value $\pm$ SEM ( $n=5$ ). .. 128
Figure 3.4	Release profiles of FITC-dextran of different molecular weights from a C84/GP solution in PBS at pH 7.4 and $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . 12 000 (●), 19 500 (○), 38 260 (■), 148 000 (□). In each experiment,

	the loading was 3%. Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). ....	129
Figure 3.5	Methylene blue (●) and calcein (○) release profiles from a C84/GP solution in PBS at pH 7.4 and $37\pm0.1^\circ\text{C}$ . Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). ....	130
Figure 3.6	FITC-albumin release profile from a C84/GP solution in PBS $\pm$ lysozyme at pH 7.4 and $37\pm0.1^\circ\text{C}$ . Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). ....	131
Figure 3.7	Total mass of the gelled C/GP solution as a function of time: C84/GP (●) and C84:C95/GP (○). Inset: dry weight of the gelled C/GP solution as a function of time: C84/GP (●) and C84:C95/GP (○). Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=3). ....	132
Figure 3.8	Scanning electron micrograph of a C84/GP solution after 24 h of exposition to the release medium (PBS) at $37\pm0.1^\circ\text{C}$ . ....	133

#### **Chapitre 4 Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules**

Figure 4.1	Kinetic model for the liposome-C/GP system. ....	150
Figure 4.2	Storage modulus as a function of time at $37\pm0.1^\circ\text{C}$ of C/GP solutions containing different concentrations of EPC/Chol liposomes. The frequency of oscillation is 1 Hz and the acquisition rate is 1 point every 13 seconds. ....	153
Figure 4.3	<i>In vitro</i> cumulative release of CF, free (triangles) or encapsulated in 100-nm (circles) or 280-nm (squares) EPC/Chol liposomes from the C/GP gel in PBS at $37^\circ\text{C}$ . Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). The solid lines represent the simulated release kinetics. ....	156
Figure 4.4	Freeze fracture electron photomicrograph of 100-nm EPC/Chol liposomes in the C/GP gel. ....	156



Figure 4.5	<i>In vitro</i> cumulative release of CF encapsulated in multilamellar 590-nm EPC/Chol liposomes, from the C/GP gel in PBS (days 0-7) and Tris buffer (days 8-14) containing phospholipase A <sub>2</sub> at 37°C. The total amount (closed circles) and the liposome-associated fraction (open circles) of CF released are shown in the figure. Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). The solid lines represent the simulated release kinetics. ....	157
Figure 4.6	<i>In vitro</i> release kinetics of CF, encapsulated in EPC (squares) or EPC/Chol (circles) 100 nm liposomes from the C/GP gel in PBS at 37°C. The total amount (closed symbols) and the liposome-associated fraction (open symbols) of CF released are shown in the figure. Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). The solid lines represent the simulated release kinetics. ....	158
Figure 4.7	<i>In vitro</i> release kinetics of CF, encapsulated in 100-nm EPC/Chol/DMPG liposomes, from the C/GP gel in PBS at 37°C. The total amount (closed circles) and the liposome-associated fraction (open circles) of CF released are shown in the figure. Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). The solid lines represent the simulated release kinetics. ....	159
Figure 4.8	<i>In vitro</i> release kinetics of CF, encapsulated in 100-nm DSPC/Chol liposomes, from the C/GP gel in PBS at 37°C. The total amount (closed circles) and the liposome-associated fraction (open circles) of CF released are shown in the figure. Each point represents the mean value $\pm$ SEM (n=5). The solid lines represent the simulated release kinetics. ....	160

## Chapitre 5 Gels d'hexaréline

Figure 5.1	Structure chimique de l'hexaréline. Tiré de (11). ....	177
Figure 5.2	Profil d'élution des liposomes et de l'hexaréline non encapsulée. ....	180

Figure 5.3	Libération de l'hexaréline à partir de la solution thermosensible chitosan/GP (196 µg hexaréline/g mélange). Moyenne ± SEM (n = 5).....	184
Figure 5.4	Libération de l'hexaréline après injection sous-cutanée de différentes formulations d'hexaréline chez le rat (118 µg/kg). Moyenne ± SEM. ....	185

## **Chapitre 6    A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel**

Figure 6.1	The C/GP formulation at room temperature (left) and at 37°C (right).....	202
Figure 6.2	<i>In vitro</i> cumulative percent release of paclitaxel from the C/GP gel in PBS + 0.3% SDS at 37°C. Initial paclitaxel loading: 64 mg/mL (closed circles), 6.4 mg/mL (open circles). Each point represents the mean value ± SEM (n=5). ....	207
Figure 6.3	HPLC spectra of paclitaxel non-irradiated (A), irradiated and stored one month at 4°C (B) and irradiated and stored two months at 4°C (C). Paclitaxel elutes at 7.8 min and the internal standard ( <i>N</i> -heptylbenzamide) elutes at 10.1 min. ....	208
Figure 6.4	<i>In vivo</i> anti-tumor effect of the treatments initiated when the tumors reached 30 mm <sup>3</sup> . Saline 0.2 mL/day IV x 4 days (closed circles, n = 10), Taxol <sup>®</sup> 10 mg/kg/day IV x 4 days (open circles, n = 12), C/GP solution 10 µL intratumoral (closed squares, n = 15) and paclitaxel/C/GP solution (64 mg/mL paclitaxel) 10 µL (40 mg/kg paclitaxel) intratumoral (open squares, n = 15). ....	210
Figure 6.5	<i>In vivo</i> anti-tumor effect for treatments initiated on day 4 after tumor inoculation. Saline 0.2 mL/day IV x 4 days (closed circles, n = 8), Taxol <sup>®</sup> 10 mg/kg/day IV x 4 days (open circles, n = 8), C/GP solution 10 µL intratumoral (closed squares, n = 8) and paclitaxel/C/GP solution (64 mg/mL paclitaxel) 10 µL (40 mg/kg paclitaxel) intratumoral (open squares, n = 8). ....	210

- Figure 6.6 Body weight of the animals for treatments initiated on day 4 after tumor inoculation. Saline 0.2 mL/day IV x 4 days (closed circles, n = 8), Taxol<sup>®</sup> 10 mg/kg/day IV x 4 days (open circles, n = 8), C/GP solution 10  $\mu$ L intratumoral (closed squares, n = 8) and paclitaxel/C/GP solution (64 mg/mL paclitaxel) 10  $\mu$ L (40 mg/kg paclitaxel) intratumoral (open squares, n = 8). ..... 211
- Figure 6.7 Tumor cross-sections demonstrating necrotic zones. Differential staining observed represents varying tumor cell conditions. A) Saline IV: darkly stained zones demonstrate areas with viable and active tumor cells. Spontaneous necrosis (light or no stain) can also be seen. B) Paclitaxel/C/GP: white arrow identifies remaining C/GP material. Tumor center has a notable lack of darkly stained viable tumor cell zones. C) C/GP material alone: clearly defined zones of necrosis are visible. D) Taxol IV: clearly defined zones of necrosis are visible. (Magnification: 4X). ..... 213

## Liste des sigles et abréviations

°C	degré Celsius
AA	acide acrylique
ADN	acide désoxyribonucléique
C84	hydrochlorure de chitosan ayant un degré de désacétylation de 84%
C95	hydrochlorure de chitosan ayant un degré de désacétylation de 95%
C/GP	solution de chitosan et de glycérophosphate
CF	carboxyfluorescéine
CFU	<i>colony forming unit</i>
Chol	cholestérol
DMPG	1,2-dimyristol- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoglycérol
DP	degré de polymérisation
DSPC	1,2-distéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphatidylcholine
EHEC	éthyl(hydroxyéthyl)cellulose
EPC	phosphatidylcholine d'œuf ( <i>egg phosphatidylcholine</i> )
GP	glycérophosphate
FBS	sérum fœtal bovin ( <i>fetal bovine serum</i> )
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GH	hormone de croissance ( <i>growth hormone</i> )
GHIH	<i>growth hormone inhibiting hormone</i>
GHRH	<i>growth hormone releasing hormone</i>
GHRP	<i>growth hormone-releasing peptides</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HEPES	N-(-2-hydroxyéthyl)-piperazine-N'-(-2-ethanesulfonic acid)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	hertz
IgG	immunoglobuline G
IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IL-1	interleukine 1
IL-6	interleukine 6

IT	intra-tumoral
IV	intra-veineux
K	° Kelvin
kGy	kilo-gray
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
HPMC	hydroxypropyl méthylcellulose
mA	milli-ampère
MC	méthylcellulose
Meth A	<i>methylcholanthrene-induced fibrosarcoma A</i>
NIPAM	<i>N</i> -isopropylacrylamide
PAA	poly(acide acrylique)
PBS	tampon phosphate isotonique ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCL	poly(ε-caprolactone)
PEG	poly(éthylène glycol)
PEO	poly(oxyde d'éthylène)
PPO	poly(oxyde de propylène)
PGA	poly(acide glycolique)
PLA	poly(acide lactique)
PLGA	copolymère d'acide lactique et glycolique
PNIPAM	poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide)
REV	<i>reverse-phase evaporation method</i>
RhEPO	erythropoïéine recombinante humaine
RMN	résonance magnétique nucléaire
SA	stéarylamine
SC	sous-cutané
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	chromatographie d'exclusion de taille ( <i>size-exclusion chromatography</i> )
SEM	microscopie électronique à balayage ( <i>scanning electron microscopy</i> )
TGase	transglutaminase
UV	ultraviolet
VRS	virus respiratoire syncytial

*Cette thèse est dédiée à Luc, Yves,  
Pauline, Murielle et Jean.*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier Jean-Christophe Leroux pour m'avoir accueillie dans son laboratoire alors que ce dernier en était à ses premiers balbutiements. Son soutien tout au long de ce projet, malgré les (nombreux) rebondissements, m'a permis de voir qu'il y a plus souvent qu'autrement une solution au problème.

Je remercie également le Dr Huy Ong qui m'a offert la possibilité de travailler avec l'hexaréline et de profiter des connaissances acquises au sein de son laboratoire. J'ai ainsi pu utiliser la méthode de dosage de l'hexaréline dans le plasma de rat mise au point par une ancienne étudiante (Marie Roumi). Un merci particulier à Petra Pohankova qui a dosé tous les échantillons recueillis au cours des expériences de libération avec l'hexaréline.

Je voudrais également remercier les coauteurs de mes articles, les Drs Abdelattif Chenite, Cyril Chaput, Grégoire Leclair, Patrice Hildgen, Ajay Gupta, Matthew Shive, Mohammed Berrada ainsi que Suzanne Guirguis, Ali Bichara et Dorothee Le Garrec, sans qui ce projet n'aurait pas existé et n'aurait jamais progressé comme il l'a fait.

Je remercie le Dr Albert Adam d'avoir accepté la présidence du jury et le Dr Julianna Juhasz d'avoir accepté d'évaluer cette thèse à titre d'examineur externe. Je tiens également à remercier le Dr Maxime Ranger d'avoir accepté de juger ce travail en tant que membre du jury. Leurs commentaires et les discussions qui en découleront sauront certainement ajouter de la valeur à ce travail.

Je voudrais remercier chaleureusement mes collègues de laboratoire, toujours présents pour des discussions concernant un problème particulier, pour donner de leur temps lors d'expériences nécessitant plus de deux mains et pour leur soutien. Je remercie particulièrement Claire Jarry qui m'a accompagnée dès le début de ce projet.

Je remercie Elvire Fournier, Marie-Andrée Yessine, Aude Motulsky et Dorothée Le Garrec pour avoir relu ce travail avec attention et apporté des suggestions fort appréciées.

Je remercie également ma famille et mes amis pour leur intérêt porté à mes travaux tout au long de ce périple et leurs encouragements. Leur curiosité et leur fascination pour ce projet m'ont permis à plusieurs reprises de prendre le recul nécessaire pour tout remettre en perspective et continuer d'avancer.

En terminant, je remercie BioSyntech et le CRSNG pour leur soutien financier.



# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

# 1 Introduction

## 1.1 Généralités

Depuis toujours, l'administration de médicaments se fait préférablement par la voie orale. Cette approche est sans douleur ni inconfort pour le patient puisqu'elle est non invasive et ne requiert aucune habileté particulière du soignant. De plus, les préparations ne nécessitent pas de stérilisation. Les formulations orales traditionnelles ne permettent cependant pas toujours un contrôle optimal des maladies. En effet, une forme à libération immédiate entraîne des niveaux sanguins élevés peu de temps après la prise, lesquels diminuent ensuite progressivement jusqu'à la prise suivante. On a alors des taux sanguins en "dents de scie" (Fig. 1.1). Étant donné que les médicaments ne sont efficaces que dans une gamme de concentrations appelée fenêtre thérapeutique, il s'ensuit des périodes de temps plus ou moins longues où les taux sanguins sont trop faibles et où il n'y a plus d'efficacité.

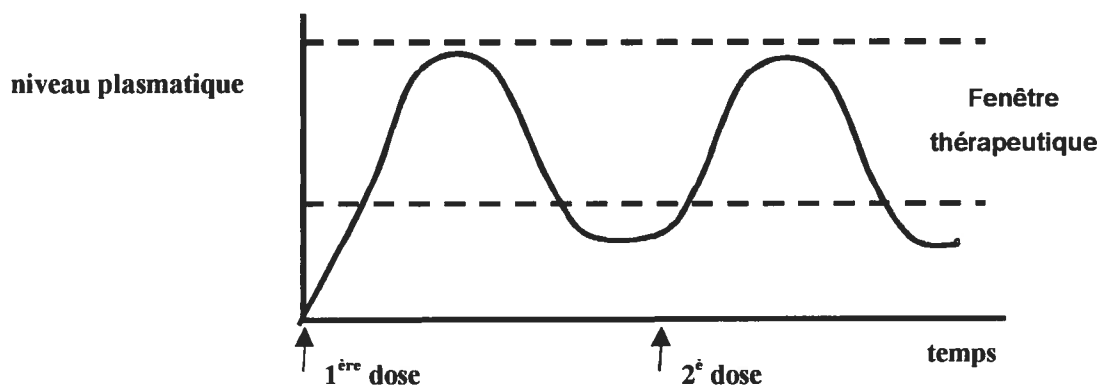


Figure 1.1 Concentration plasmatique en fonction du temps suite à une administration orale répétée d'une dose fixe de médicament.

Un autre facteur pouvant faire varier considérablement les taux sanguins de médicaments est l'observance du patient au traitement. Celle-ci peut se définir comme la prise des doses prescrites au moment requis pour la période de temps déterminée. La non-observance peut entraîner plusieurs conséquences telles qu'une détérioration de l'état de santé, des consultations médicales supplémentaires, l'utilisation de plus de médicaments, des admissions à l'hôpital et l'augmentation des coûts directs et indirects de la gestion de la maladie. L'inobservance est une cause importante d'échec thérapeutique. Plusieurs raisons peuvent amener les gens à ne pas respecter la posologie prescrite. On peut citer, par exemple, l'apparition d'effets secondaires, une formulation difficile à avaler ou ayant un goût désagréable, le coût élevé des médicaments par rapport aux revenus de l'individu, le fait que le patient ne voit pas les avantages du traitement (ex: hypertension) et un horaire de prise peu compatible avec le régime de vie. Le facteur influençant le plus l'observance est la fréquence des prises. Plusieurs études ont montré que lorsqu'elles sont moins fréquentes, l'observance augmente. Greenberg (1), après analyse des résultats de 26 études, a révélé que l'observance est en moyenne de 73% lorsque le traitement requiert une prise par jour, de 70% avec deux prises par jour, de 52% avec trois prises par jour et de 42% avec quatre prises par jour. Dans ces études, l'observance était évaluée à l'aide de questionnaires, de dosages sanguins ou urinaires et en faisant le décompte des doses non-prises par le patient à la fin de l'étude. Claxton *et al.* (2) ont effectué une méta-analyse sur 76 études utilisant un système électronique de suivi des prises de médicaments. Les auteurs arrivent à la même conclusion que Greenberg, l'observance passant de  $79 \pm 14\%$  avec un régime une fois par jour à  $51 \pm 20\%$  avec un régime quatre fois par jour. De Klerk (3) a montré que, dans le cadre d'une thérapie contre la dépression, l'observance était meilleure avec la formulation dosée à 90 mg à 1 prise par semaine qu'avec la formulation à 20 mg à 1 prise par jour (88% vs 79%,  $p = 0.006$ ). De plus, dans une étude complémentaire, Judge (4) a révélé que 39% des patients dépressifs n'aimaient pas prendre des médicaments tous les jours et que 26% d'entre eux se sentiraient en meilleure santé s'ils prenaient leur antidépresseur seulement une fois par semaine. Des traitements requérant moins de prises permettent donc une meilleure observance et ce pour plusieurs classes thérapeutiques (maladies cardiovasculaires, respiratoires, infectieuses, cancer, psychiatrie, épilepsie) (1, 2).

Afin de pallier les profils sanguins en dents de scie et les problèmes d'observance, diverses formulations à libération prolongée ont été proposées. Celles-ci ont pour objectif de maintenir les taux sanguins de médicament à l'intérieur de la fenêtre thérapeutique pour des périodes allant de quelques heures à quelques mois selon les besoins du traitement (Fig. 1.2).

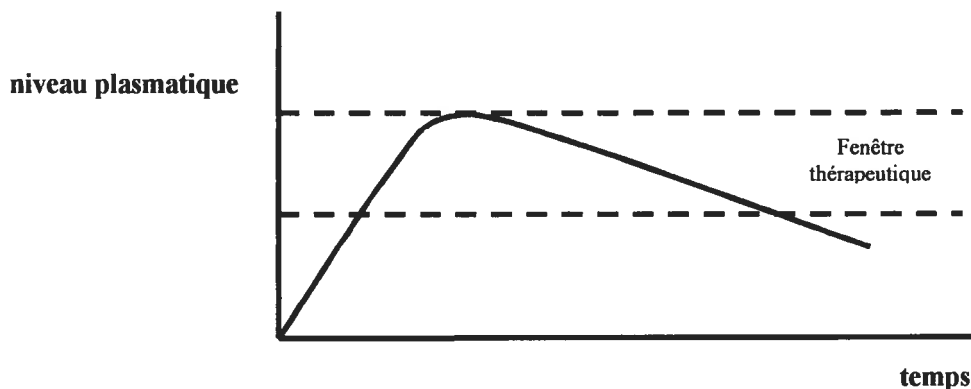


Figure 1.2 Concentration plasmatique en fonction du temps suite à l'administration d'une formulation à libération prolongée.

Certaines formulations orales traditionnelles ont ainsi été adaptées afin de réduire le nombre de prises par jour. Ce type de modification est particulièrement intéressant dans le cadre d'une thérapie à long terme. Par exemple, pour le traitement de l'angine, le chlorhydrate de diltiazem est disponible en trois formats. Il y a le Cardizem<sup>®</sup> (3-4 fois par jour), le Cardizem<sup>®</sup> SR (2 fois par jour) et le Cardizem<sup>®</sup> CD (1 prise quotidienne). Le Cardizem<sup>®</sup> est habituellement utilisé pour contrôler un épisode d'angine, car il permet d'ajuster rapidement la thérapie aux besoins du patient. Lorsqu'un régime à long terme est nécessaire, il est alors possible de convertir les doses de Cardizem<sup>®</sup> en Cardizem<sup>®</sup> SR ou Cardizem<sup>®</sup> CD et ainsi diminuer le nombre de prises quotidiennes. D'autres molécules ont été incorporées dans des formulations permettant une libération sur plusieurs jours. On peut citer, par exemple, le Dépo-Provera<sup>®</sup>, un contraceptif. Il s'agit d'acétate de médroxyprogesterone en suspension dans un véhicule destiné à la voie intra-musculaire. Ce produit est administré aux trois mois et fournit aux

patientes une option différente des comprimés oraux devant être pris à tous les jours.

Des médicaments ne pouvant être administrés que par la voie parentérale font également l'objet d'études pour la mise au point d'une forme à libération prolongée. On peut citer, par exemple, l'hormone de croissance (5), l'insuline (6-8) et le paclitaxel (9-12). Ces médicaments, souvent fragiles, sont largement métabolisés au niveau du tractus gastro-intestinal ou n'y sont pas absorbés et doivent être administrés par une voie plus directe telle que la voie intra-veineuse, sous-cutanée ou intra-musculaire. Toutefois, malgré une bonne efficacité suite à une administration parentérale, leur effet est de courte durée car ils sont rapidement éliminés. Des injections fréquentes sont donc nécessaires pour obtenir l'effet recherché. La mise au point d'une formulation à libération prolongée dans pareil cas permettrait d'obtenir un effet soutenu sans avoir recours à des injections répétées.

Dans notre introduction, nous nous pencherons exclusivement sur les formulations à libération prolongée destinées à la voie parentérale.

## 1.2 Formulations à libération prolongée destinées à la voie parentérale

L'approche la plus courante pour obtenir une libération continue de médicament sur une longue période est l'utilisation d'une forme dépôt. Cette dernière est placée dans un endroit prédéterminé du corps d'où elle libère son contenu à une vitesse donnée par différents phénomènes tels que la diffusion et l'érosion. Les formes dépôt peuvent être classées selon le schéma suivant (Fig. 1.3).

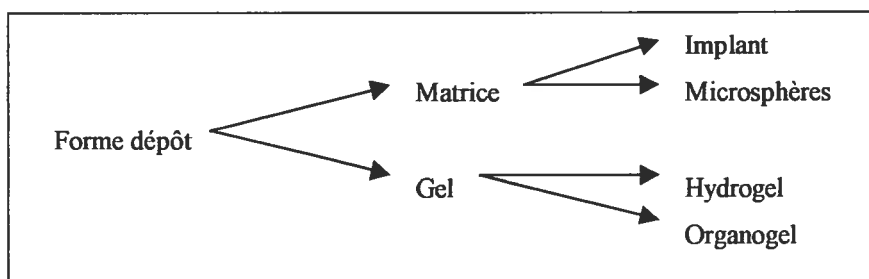


Figure 1.3 Classification des formes dépôts

Il existe deux types de formes dépôt: celles qui sont insérées dans le corps par chirurgie (implant) et celles qui sont injectables (microsphères, gel). La première catégorie nécessite un personnel qualifié et du matériel spécial (ex: trocart) pour la mise en place et amène un risque d'infection. La deuxième catégorie est plus intéressante. En effet, l'administration est moins compliquée et moins douloureuse pour le patient puisqu'une seringue traditionnelle suffit.

Les matrices sont des formes solides dans lesquelles le médicament est distribué de façon homogène à l'état dissous ou dispersé. Les matrices sont habituellement fabriquées à l'aide de polymères biodégradables tels que le poly(acide lactique) (PLA), les copolymères d'acide lactique et glycolique

(PLGA) ou la poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL). Les médicaments sont libérés des matrices par diffusion ou suite à l'érosion de celles-ci. La fabrication de ces systèmes est simple (13). Toutefois, l'encapsulation nécessite généralement l'utilisation des solvants organiques ou de températures élevées pouvant être dommageables pour certains principes actifs. De plus, l'érosion des polymères de type polyester (PLGA, PLA) peut entraîner la création d'un microenvironnement acide nuisible à la stabilité du composé incorporé (14-17).

Les gels sont des formes semi-solides contenant des éléments solides et des éléments liquides. La partie solide forme un réseau tridimensionnel de molécules ou d'agrégats immobilisant la partie liquide. De nombreux polymères naturels et synthétiques forment des gels. On en distingue deux types selon la nature de la phase continue. Dans les hydrogels, elle est aqueuse alors que dans les organogels, elle est constituée d'un solvant organique ou de lipides. Les gels peuvent donc accommoder des composés tant hydrophiles qu'hydrophobes. Cependant, ils sont souvent très poreux, ce qui limite leur capacité à retenir les molécules incorporées et ne permet pas une libération sur de longues périodes de temps (18-20).

Plusieurs approches sont utilisées pour mettre au point une forme dépôt. Celles permettant la mise au point d'un produit injectable qui forme un dépôt au site d'injection (*in situ*) sont présentées ci-dessous. Les formes implantables nécessitant une chirurgie ne seront pas abordées.

### 1.2.1 Les microsphères

Les formes dépôt à base de microsphères sont habituellement des suspensions destinées à la voie sous-cutanée ou intra-musculaire. Les microsphères sont des systèmes matriciels dans lesquels le médicament est

dissous ou dispersé; il peut aussi être adsorbé à la surface. Elles sont composées de polymères naturels ou synthétiques, biodégradables ou non. Les polymères biodégradables sont les plus étudiés car ils sont plus appropriés pour une application médicale. Ceux-ci sont dégradés *in vivo* par voie enzymatique, non-enzymatique ou une combinaison des deux. Les produits de dégradation sont généralement biocompatibles, non-toxiques et sont éventuellement éliminés de l'organisme par l'entremise des voies métaboliques normales (21-25). Parmi ces polymères, on retrouve l'albumine, le collagène, la gélatine, le chitosan, les poly(amides), les poly(aminoacides), les poly(cyanoacrylates d'alkyle), les poly(esters), les poly(ortho esters), les poly(uréthanes) et les poly(acrylamides) (21, 25, 26). Il est important de noter que les polymères naturels biodégradables ont une utilité limitée étant donné leur coût élevé et leur pureté parfois discutable. La préparation de microsphères pour injection nécessite l'utilisation d'un polymère sécuritaire, bien toléré et insoluble dans l'eau. C'est la raison pour laquelle les poly(esters) comme le PLA, le poly(acide glycolique) (PGA) et le PLGA sont les plus fréquemment employés.

Quelques produits à base de microsphères sont présentement disponibles au Canada et aux États-Unis. Il s'agit du Lupron Dépôt<sup>®</sup>, du Sandostatin<sup>®</sup> LAR<sup>™</sup>, du Nutropin Dépôt<sup>®</sup> et du Risperdal<sup>®</sup> Consta<sup>™</sup>. Ces produits sont à base de PLGA ou de PLA et sont destinés à la voie intra-musculaire ou sous-cutanée. Le Lupron Dépôt<sup>®</sup> permet l'administration prolongée (1, 3 ou 4 mois) d'acétate de leuprolide pour le traitement palliatif du cancer de la prostate, sensible aux hormones sexuelles (Fig. 1.4) (27). L'administration prolongée de leuprolide inhibe la production de gonadotropines et empêche la progression des tumeurs.



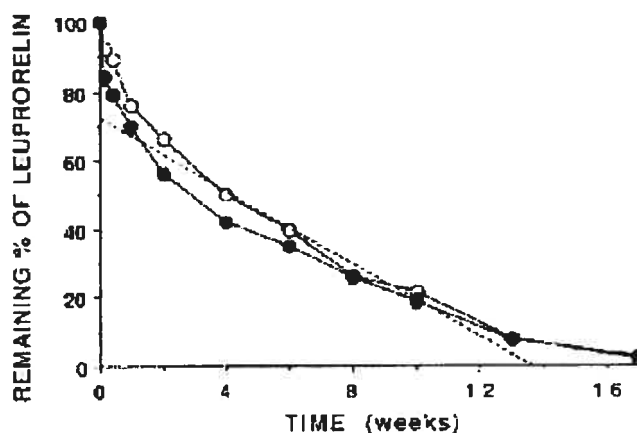


Figure 1.4 Libération *in vivo* (rat) de leuprolide à partir d'un dépôt de microsphères de PLA après injection sous-cutanée (○) ou intra-musculaire (●). Tiré de (27).

Le Sandostatin® LAR™ est utilisé dans le traitement de l'acromégalie. Il s'agit d'une forme à libération prolongée (1 mois) d'octréotide, un octapeptide synthétique analogue de la somatostatine. Le Nutropin Dépôt® est destiné aux enfants souffrant d'une déficience en hormone de croissance. Il permet l'administration d'hormone de croissance recombinante 1 ou 2 fois par mois au lieu de 3-4 fois par semaine. Le Risperdal® Consta™ (risperidone) a été approuvé dernièrement (octobre 2003) par la FDA. Tout comme le Risperdal®, il est utilisé dans le traitement de la schizophrénie. Cette nouvelle formulation permet un traitement de maintien ne requérant qu'une injection toutes les 2 semaines au lieu d'une prise orale quotidienne.

Malgré le peu de produits disponibles sur le marché utilisant cette technologie, les microsphères demeurent une des approches les plus étudiées pour la mise au point d'une forme dépôt. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont été publiées traitant du développement de microsphères d'érythropoïétine (rhEPO) (28), de calcitonine (29, 30), de 5-fluorouracil (31), de paclitaxel (12, 32, 33), d'insuline (34) ou de cisplatine (35). Ces quelques

exemples montrent bien la diversité des composés pouvant être incorporés dans ces matrices.

## 1.2.2 Les implants auto-formants

Dans cette section seront présentés des systèmes qui sont liquides au départ et se modifient suite à l'injection. Nous verrons que plusieurs approches peuvent être utilisées pour initier la transformation: la photopolymérisation, l'auto-assemblage de molécules de faible poids moléculaire, la formation de stéréocomplexes ou la variation des propriétés d'un polymère en fonction des conditions environnantes (solvant, ions, pH, température).

### 1.2.2.1 Photopolymérisation

La lumière peut être utilisée pour initier la transformation (36-40). Dans ce type de préparation, un ou des composés photoréactifs servent à polymériser un monomère. Lorsque le mélange est irradié, les composés photoréactifs deviennent instables et amorcent la polymérisation. An et Hubbell (36) ont utilisé la lumière visible (514 nm) pour couvrir la surface interne de carotides de rats (*ex vivo*) d'un dépôt à base de poly(éthylène glycol)-diacrylate; celui-ci devant éventuellement servir de matrice pour la libération de médicaments afin de prévenir la resténose suite à une angioplastie. Un groupe du Japon (37-40) a choisi l'utilisation de rayons UV (240-380 nm) pour initier la polymérisation d'un dérivé de chitosan. Il s'agit d'une molécule de chitosan (CH) contenant un groupement lactose (LA) ainsi qu'un groupement azide (Az) photoréactif. Ce dérivé (Az-CH-LA) a été développé en tant que bioadhésif afin de remplacer la colle à base de fibrine dont la production industrielle est complexe et qui comporte un risque d'infection. L'application de rayons UV à la solution de Az-Ch-LA produit un gel insoluble en moins de 60 secondes (Fig. 1.5). Ce dernier est capable d'arrêter une petite hémorragie en moins de 30 secondes et de

maintenir fermement ensemble deux morceaux de peau. Sa capacité de liaison est similaire à celle de la fibrine. De plus, il accélère la fermeture des plaies et leur guérison. Il peut également servir de matrice pour la libération de composés destinés à accélérer la guérison. Ces résultats sont très intéressants mais il ne faut pas oublier que l'utilisation de la photopolymérisation nécessite la disponibilité d'un appareillage spécial ce qui limite les conditions d'utilisation.

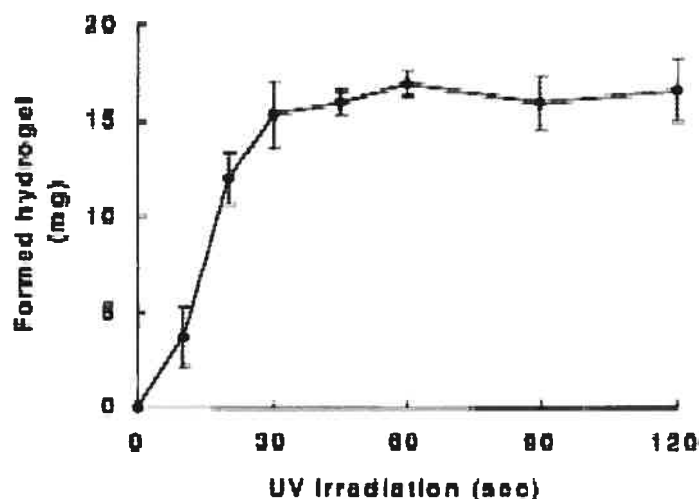


Figure 1.5 Temps d'irradiation (UV) nécessaire pour entraîner la gélification du dérivé de chitosan Az-CH-LA. Tiré de (37).

### 1.2.2.2 Précipitation suite à la modification du solvant

Cette approche consiste à dissoudre un polymère non hydrosoluble dans un solvant biocompatible et miscible à l'eau. Lorsque la solution est injectée, le solvant permettant la solubilisation du polymère diffuse dans les tissus environnants ce qui entraîne la précipitation du polymère au site d'injection emprisonnant ainsi le médicament. On obtient alors une masse compacte à partir de laquelle le médicament est libéré. Plusieurs études ont été faites sur ces systèmes, la majorité utilisant du PLGA dissous dans de la *N*-méthyl pyrrolidone ou du glycofurol (41-45). Cette technique présente toutefois quelques inconvénients. Premièrement, la formation de l'implant peut être incomplète *in*

*vivo*. Une grande quantité de médicament est alors libérée dans les premiers temps après l'injection, ce qui peut entraîner une toxicité locale ou systémique. De plus, au moment de la formation de l'implant, il est difficile de prévoir quelle proportion de médicament sera entraînée avec le solvant. Enfin, le solvant organique utilisé pour solubiliser le polymère peut dénaturer les composés fragiles tels que les protéines. Malgré ces contraintes, la compagnie Atrix Laboratories a mis sur le marché (aux Etats-Unis) quelques produits utilisant cette approche avec leur technologie baptisée Atrigel<sup>®</sup>. Entre autres, une formulation de doxycycline destinée à l'usage dentaire, Atridox<sup>®</sup>, a été acceptée en 1998 et une de leuprolide pour le traitement palliatif du cancer de la prostate, Eligard<sup>®</sup>, a été approuvée en 3 régimes posologiques (1, 3 ou 4 mois) au cours des années 2002 et 2003. Un quatrième (6 mois) est présentement en études cliniques. Une variante de cette approche consiste à utiliser un mélange d'isobutyrate d'acétate de sucrose ("*sucrose acetate isobutyrate*", SAIB) et d'un solvant organique (éthanol, *N*-méthyl pyrrolidone ou Miglyol<sup>®</sup> 180). Le SAIB est un liquide très visqueux. L'ajout du solvant organique entraîne une réduction importante de la viscosité et permet l'injection. Par la suite, le solvant diffuse dans les tissus environnants et le SAIB forme un dépôt. Ce dernier est biodégradable et permet la libération d'une grande variété de composés sur une période de quelques jours à 3 mois. Okumu *et al.* (46) ont étudié le potentiel de ce système pour la libération prolongée d'hormone de croissance. Une étude chez le rat a révélé que cette formulation permet une libération sur 7 jours et n'entraîne qu'une légère inflammation au site d'injection.

### 1.2.2.3 Organogels

Les organogels sont des gels dont la phase continue est non-aqueuse. Ils peuvent être obtenus à l'aide d'une molécule dite organogélatrice (47) ou avec certains lipides amphiphiles (48). Dans le premier cas, les molécules organogélatrices s'assemblent pour former des fibres ou des filaments qui finissent par se joindre et former un réseau tridimensionnel qui emprisonne le solvant et empêche son écoulement. Les forces stabilisant cet arrangement

peuvent être des ponts hydrogène, des attractions électrostatiques, des interactions  $\pi$ - $\pi$  ou des forces de van der Waal (47, 49). Par exemple, Murdan *et al.* (50, 51) ont utilisé le monostéarate de sorbitane (Span® 60, 10% *p/v*) pour gélifier l'hexadécane et le myristate d'isopropyl. Le gel formé est blanc opaque. Il a une texture lisse et est stable quelques semaines *in vitro*. L'ajout de polysorbate 20 (Tween® 20, 2% *p/v*) améliore la stabilité *in vitro* à quelques mois. Le principal désavantage de ce système est la nécessité de chauffer la préparation à 60°C pour permettre l'injection, ce qui peut rendre la procédure douloureuse pour le patient. Dernièrement, Couffin *et al.* (52) ont proposé une nouvelle méthode de préparation permettant une injection à la température ambiante. L'organogélateur utilisé était un dérivé de L-alanine. Afin de pouvoir injecter l'organogel, les auteurs ont ajouté un inhibiteur de gélification qui diffuse dans les tissus environnants après injection et permet la formation de l'organogel. Une étude de libération *in vitro* (dextran) a montré que le système pouvait libérer un composé hydrophile sur une période prolongée puisque seulement 6% de la dose incorporée était libérée en 20 jours. De plus, une étude chez le rat a révélé que la gélification *in situ* était rapide et que l'intégrité du gel était conservée pendant plus d'une semaine.

Dans le deuxième cas, c'est une réorganisation des molécules qui entraîne la gélification. Certains lipides polaires amphiphiles s'organisent en structures définies lorsqu'ils sont placés dans un milieu aqueux. Selon la température et le contenu aqueux, ils forment une phase micellaire inversée ( $L_2$ ) ou un des trois types de phases liquides cristallines (lamellaire, hexagonale inversée ou cubique) (Fig. 1.6). L'exemple le plus étudié de ces lipides est le monooléate de glycérol. Une préparation à base de ce dernier contenant 10-20% d'eau forme une phase  $L_2$  à la température ambiante et une phase cubique à la température du corps lorsque son contenu en eau atteint ~35%. Plusieurs auteurs ont proposé d'utiliser cette propriété pour développer un dépôt auto-formant. En effet, la préparation sous forme  $L_2$  a une viscosité assez faible pour permettre l'injection et le contact avec les fluides biologiques entraîne la transformation en phase cubique (solide) par augmentation du contenu aqueux. Une revue récente présente les différentes

études effectuées avec ce système (53). Des médicaments hydrophiles ou hydrophobes de masse molaire variable peuvent y être incorporés. Il faut cependant souligner que cette approche ne permet qu'une libération de courte durée (2-3 jours). On doit également s'assurer que les composés incorporés n'interfèrent pas avec l'assemblage des lipides. Un avantage intéressant de ce système est sa biodégradabilité puisqu'il n'est composé que d'eau et de lipides.

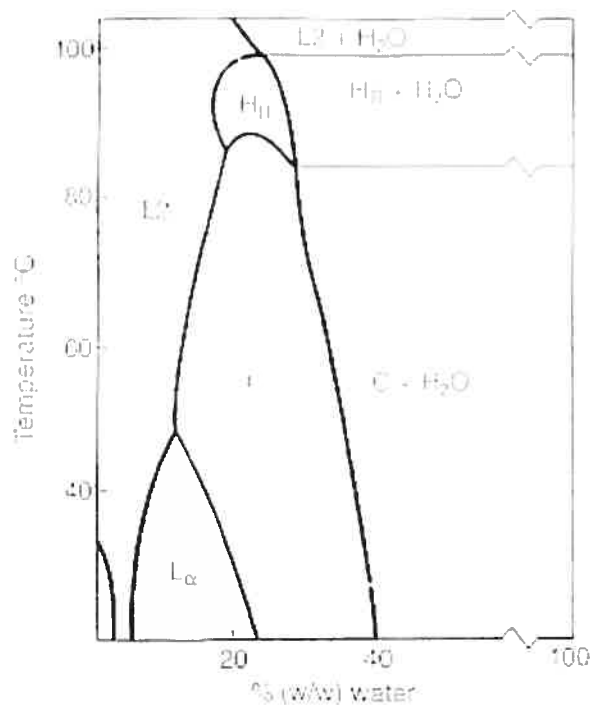


Figure 1.6 Diagramme de phase du système monooléate de glycérol-eau montrant la phase micellaire inversée ( $L_2$ ), la phase lamellaire ( $L_\alpha$ ), la phase cubique (C) et la phase hexagonale inversée ( $H_{II}$ ). Tiré de (53).

#### 1.2.2.4 Formation de stéréocomplexes

La stéréocomplexation est la formation d'un complexe entre deux énantiomères de chiralité opposée (L et D). De Jong *et al.* ont ainsi proposé d'utiliser les liens se formant spontanément entre le L-lactide et le D-lactide pour former un nouveau type d'hydrogel (54). Pour cela, les auteurs ont d'abord déterminé quelle longueur de chaîne (degré de polymérisation, DP) de chaque énantiomère permettait la formation de stéréocomplexes à température ambiante sans qu'il y ait formation de cristaux dans la solution de l'énantiomère seul. Ensuite, ils ont synthétisé des copolymères de dextran et d'acide lactique. Leur but était de former un hydrogel de dextran pour la libération de composés fragiles tels que les protéines. Leur préparation était composée d'une solution de dextran-g-poly(L-lactide) et d'une solution de dextran-g-poly(D-lactide). Lorsque des quantités égales des deux solutions étaient mélangées, il y avait formation d'un hydrogel à température ambiante (55). Ce gel a l'avantage de présenter un environnement aqueux compatible avec les composés fragiles et de générer des produits de dégradation biocompatibles. Les auteurs ont montré que l'hydrogel se dégradait dans des conditions physiologiques (*in vitro*) en 1 à 7 jours et qu'il pouvait libérer des protéines modèles (IgG et lysozyme) sur une période d'environ 6 jours (56). Pour l'instant, aucune donnée chez l'animal n'est disponible. L'idée d'utiliser la complexation du L-lactide et du D-lactide pour former un hydrogel a également été étudié par Li et Vert (57). Pour cela des copolymères triblocs à base de poly(L-lactate) (PLLA) et de poly(D-lactate) (PDLA) ont été synthétisés. Il s'agit du PLLA-PEO-PLLA et du PDLA-PEO-PDLA. Le mélange des solutions d'énantiomères entraînait la formation d'un hydrogel à la température ambiante en 24 à 48 heures.

Les systèmes décrits jusqu'à maintenant présentent certains inconvénients. Par exemple, la photopolymérisation nécessite une intervention externe et du matériel spécialisé. La technique qui tire avantage d'une modification du solvant n'est intéressante que dans la mesure où les solvants utilisés sont compatibles avec le composé à incorporer. Il en va de même pour les organogels. Dans le cas

des stéréocomplexes, la gélification n'est fonction que de la vitesse à laquelle s'assemblent les énantiomères. Cette variable est difficile à contrôler. Les systèmes abordés maintenant sont de nature aqueuse et forment un solide seulement lorsqu'ils sont dans des conditions physiologiques. Leur gélification peut être initiée par le contact avec des ions particuliers ou par la modification du pH ou de la température du milieu environnant.

### 1.2.2.5 Gélification en présence d'ions

Certains polymères forment des réseaux tridimensionnels en présence d'ions particuliers. Par exemple, la gomme gellane (Fig. 1.7A) forme un gel lorsqu'elle entre en contact avec des cations mono ou divalents. De même, les chaînes d'alginate (Fig. 1.7B), un copolymère formé d'acide  $\beta$ -D-manuronique (M) et d'acide  $\alpha$ -L-gulonique (G), s'assemblent grâce à des ions calcium.

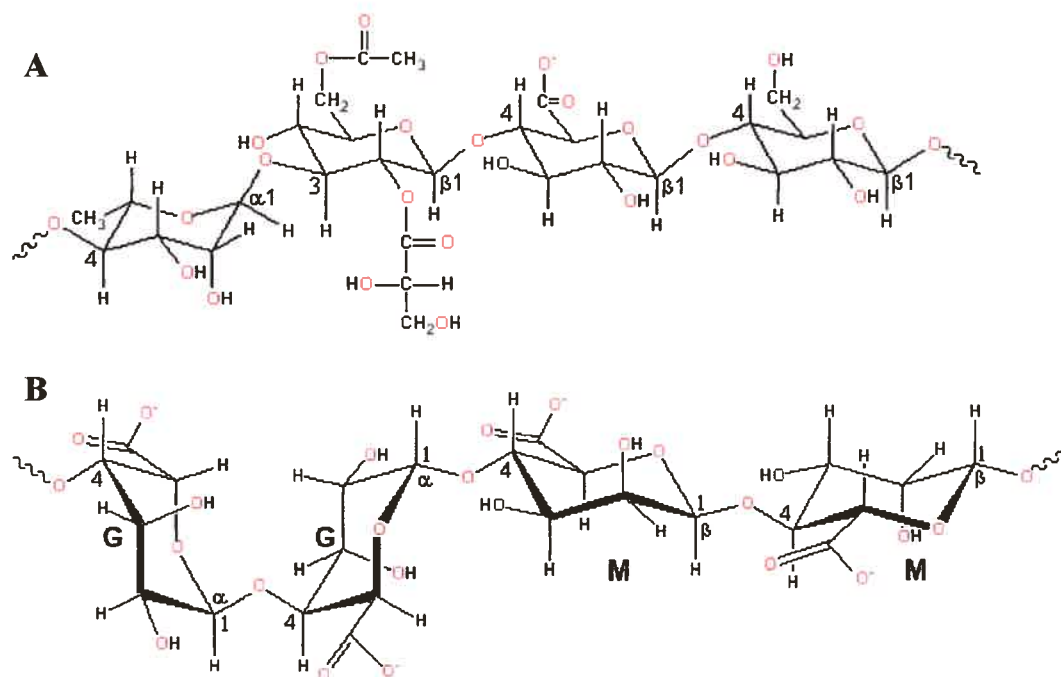


Figure 1.7 Structure chimique de la gomme gellane (A) et de l'alginate (B).



Ces polymères ont été évalués pour la mise au point d'inserts ophtalmiques. Rozier *et al.* (58) ont montré que la concentration de sodium au niveau des larmes permettait une gélification rapide de la solution de gomme gellane et que le gel permettait une meilleure pénétration du timolol au niveau de la cornée qu'une solution d'hydroxyéthylcellulose de viscosité égale. Les essais *in vivo* de Cohen *et al.* (59) ont révélé que l'administration ophtalmique de pilocarpine à l'aide d'une solution d'alginate permettait un meilleur contrôle de la pression intra-oculaire qu'une solution de pilocarpine; le gel procurait un effet pendant 10 heures contrairement à 3 heures pour la solution contrôle (Fig. 1.8).

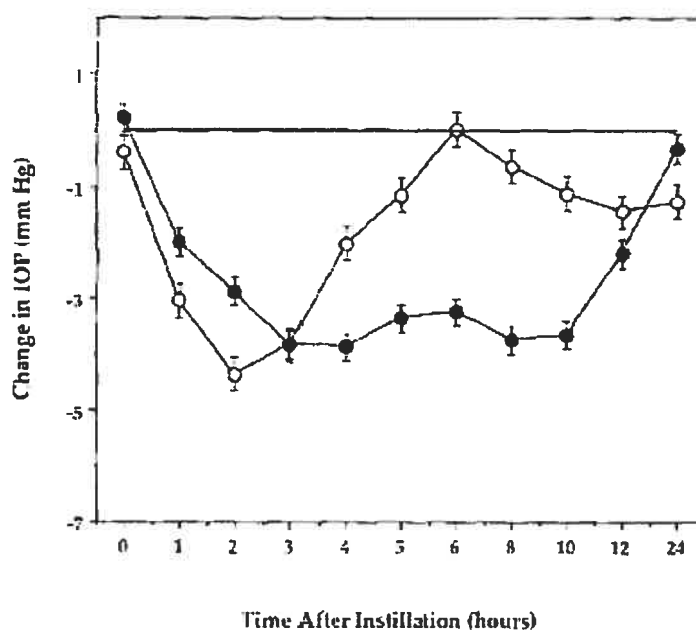


Figure 1.8 Évolution de la pression intra-oculaire chez le lapin après l'administration de nitrate de pilocarpine en solution 2% (p/v) (○) ou à l'aide de la formulation d'alginate 1% (p/v) (●). Tiré de (59).

### 1.2.2.6 Gélification en fonction du pH

Il est également possible d'obtenir un dépôt se formant *in situ* en tirant profit d'un changement de solubilité en fonction du pH (60, 61). Des implants ophtalmiques ont ainsi été développés. Ces systèmes sont à base de Carbopol® et de dérivés de cellulose. Le Carbopol® est un poly(acide acrylique) réticulé dont les solutions aqueuses présentent une transition sol-gel lorsque le pH est amené au-dessus du pKa, soit  $\sim 5.5$ . Il y a donc gélification au pH physiologique (7.4). Srividya et al. (61) ont montré que le gel formé permet une libération d'ofloxacin sur une période de 8 heures *in vitro* (Fig. 1.9). Des études de compatibilité chez le lapin ont révélé que la préparation était très bien tolérée et qu'elle n'entraînait aucun dommage au niveau de l'œil.

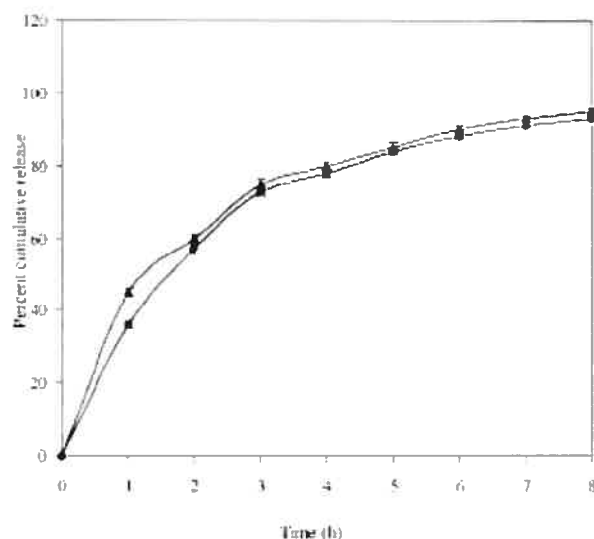


Figure 1.9 Libération *in vitro* d'ofloxacin à partir d'un système gélifiant *in situ* en fonction du pH. Tiré de (61).

### 1.2.2.7 Gélification en fonction de la température

Il est aussi possible de tirer profit d'un changement de température pour initier la formation d'un dépôt. Les systèmes les plus intéressants pour des applications biomédicales sont ceux étant liquides à température ambiante et solides à 37°C. Plusieurs polymères thermosensibles ont été étudiés comme les polysaccharides tels que la méthylcellulose (MC), l'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC), l'éthyl(hydroxyéthyl)cellulose (EHEC), le xyloglucan et le chitosan. Ont également été examinés les copolymères de *N*-isopropylacrylamide (NIPAM), le poly(oxyde d'éthylène)-*b*-poly(oxyde de propylène)-*b*-poly(oxyde d'éthylène) (PEO-PPO-PEO) (Poloxamer ou Pluronic®) et ses copolymères ainsi que les copolymères de poly(éthylène glycol) et de PLGA. Ces différents systèmes sont analysés en détail dans la revue de littérature présentée au chapitre 2 et ne sont ici que brièvement décrits.

#### 1.2.2.7.1 Dérivés de cellulose

Dans l'eau, contrairement à la majorité des polymères naturels, certains dérivés de cellulose sont à l'état "sol" à basse température et à l'état "gel" à haute température. La MC et l'HPMC sont les exemples les plus étudiés (62, 63). Les solutions aqueuses de MC forment un gel opaque à des températures variant entre 40 et 50°C alors que les solutions aqueuses d'HPMC ont une transition entre 75 et 90°C. Même si les températures de transition sont élevées pour ces solutions, il est possible de les modifier en ajoutant certains sels ou en variant le degré de substitution de la chaîne principale (62, 63). Tate *et al.* (64) ont évalué différentes formes dépôts à base de MC pour la réparation tissulaire au niveau du cerveau. Les solutions de MC ont été préparées dans du tampon phosphate salin (PBS) de façon à obtenir une faible viscosité à 23°C et un gel souple à 37°C. Les études *in vivo* ont montré que la solution gélifiait bien au niveau cérébral et était biocompatible.

Les solutions aqueuses d'EHEC sont aussi thermosensibles. Toutefois, l'augmentation de la température entraîne une diminution de la viscosité ce qui ne permet pas la formation d'un dépôt. À la fin des années 1980, Carlsson *et al.* ont montré que l'ajout d'un surfactant ionique approprié à la solution d'EHEC en inversait le comportement (une augmentation de température entraîne une augmentation de la viscosité) (65, 66). Scherlund *et al.* (19) ont évalué ce système pour l'administration périodontale d'agents anesthésiants (lidocaïne et prilocaïne). Les quantités de médicaments incorporées n'ont pas affecté le processus de gélification et les formulations testées libéraient le principe actif de façon soutenue pendant 60 min. Ces formes dépôts seraient donc appropriées pour un contrôle occasionnel de la douleur. Les systèmes à base de dérivés de cellulose sont intéressants car ils ne requièrent que de faibles concentrations de polymère. Cependant, pour ce qui est de celui à base d'EHEC, le potentiel toxique du surfactant ionique le rend moins attrayant.

#### 1.2.2.7.2 Xyloglucan

Le xyloglucan est un polysaccharide dérivé des graines de tamarin formant des solutions thermosensibles après dégradation partielle par la  $\beta$ -galactosidase. Il s'agit d'un mélange d'heptasaccharide, d'octosaccharide et de nonasaccharide ayant une chaîne principale de glucose et des chaînes latérales de xylose et de galactose. La transition sol-gel en fonction de la température apparaît lorsque au moins 35% des résidus galactose sont éliminés et celle-ci est inversement proportionnelle au pourcentage de résidus galactose éliminés (67). Le groupe d'Attwood a étudié le potentiel biomédical de ces solutions. Il a d'abord été établi que le xyloglucan choisi (44% des résidus galactose éliminés) formait un gel lorsque la température passait de 22 à 27°C (68). Des études *in vivo* ont par la suite montré que la solution de xyloglucan pouvait prolonger l'effet des médicaments suite à une administration rectale (68), intra-péritonéale (69) ou orale (70, 71) (Fig. 1.10). En effet, les solutions de xyloglucan restaient au site d'administration plus longtemps que les préparations contrôles et permettaient l'obtention de concentrations plasmatiques plus élevées sur une

période plus étendue. Ces solutions sont également intéressantes pour l'administration ophtalmique de principes actifs puisqu'elles permettent d'obtenir un effet prolongé comparable à celui obtenu avec une solution de poloxamer 407 (72). Enfin, ce système a été évalué pour l'administration transdermique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (ibuprofène, kétoprofène) et s'est révélé plus efficace que le poloxamer 407 (73).

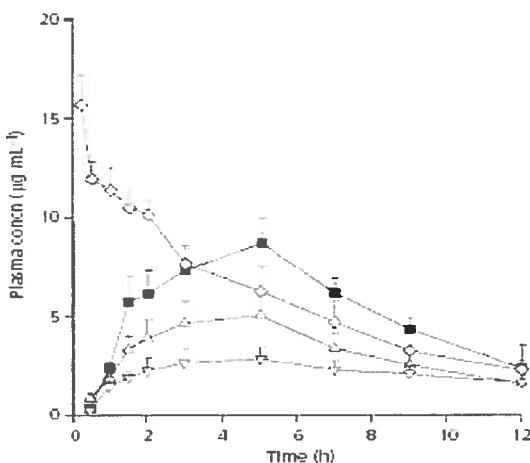


Figure 1.10 Concentrations plasmatiques de théophylline après administration chez le lapin d'une solution aqueuse par voie intra-veineuse (losange), d'une solution 1.5% *p/p* de xyloglucan par voie orale (carré), de sirop Theo-Dur® (triangle) ou de sirop Theo-Dur Dry® (triangle inversé). Tiré de (71).

#### 1.2.2.7.3 Poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acide acrylique) (*P(NIPAM-co-AA)*)

Le PNIPAM est un polymère précipitant en solution aqueuse lorsque la température est augmentée au-dessus de  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ . Han et Bae (74) ont montré qu'un copolymère *P(NIPAM-co-AA)* (2%mol d'acide acrylique) en solution à 4% *p/p* ou plus formait un gel et non un précipité lorsque la température était augmentée (Fig. 1.11).

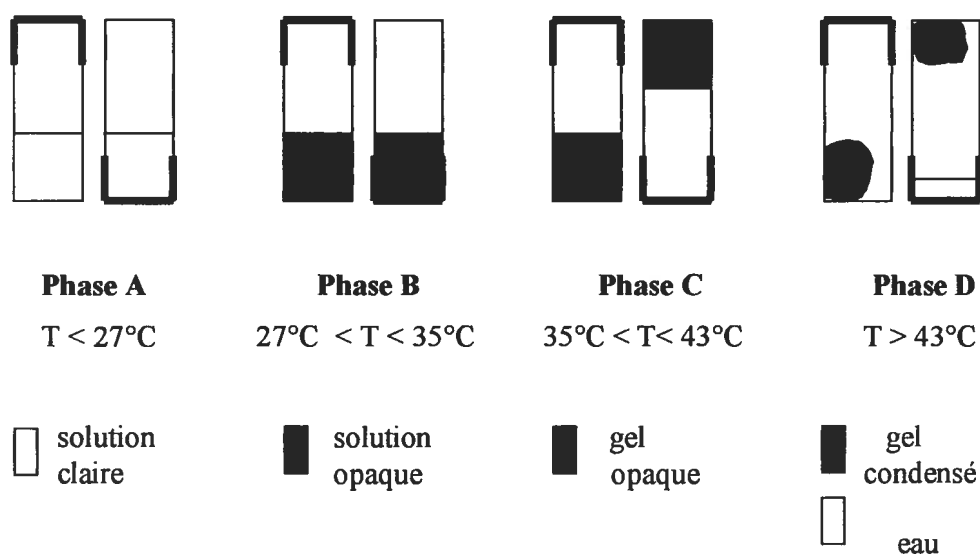


Figure 1.11 Transitions de phase et processus de gélification lors de l'augmentation de température d'une solution aqueuse de P(NIPAM-co-AA). Tiré de (74).

Le groupe de Bae proposa d'utiliser ce copolymère en tant que matrice cellulaire dans la mise au point d'un pancréas artificiel (75-80). Ce dernier serait composé d'une pochette biocompatible, implantée chez le patient, à l'intérieur de laquelle serait placée une suspension d'îlots de Langherans. Ces derniers ont tendance à s'agglomérer après isolation et la solution thermosensible une fois gélifiée permettrait de les isoler les uns des autres prévenant ainsi leur nécrose. De plus, la réversibilité sol-gel de la suspension cellulaire faciliterait le remplacement lorsque les îlots deviendraient non fonctionnels. En effet, il suffirait de diminuer la température de la préparation pour qu'elle redevienne liquide. A ce moment, il est possible de la retirer de la pochette et de la remplacer par une suspension fraîche d'îlots de Langherans. Les études *in vitro* ont montré que la solution thermosensible encapsulait bien les îlots de Langherans lors de la transition sol-gel, que l'encapsulation ne gênait pas la sécrétion d'insuline et qu'elle permettait de maintenir la fonctionnalité des cellules plus longtemps. Lors d'expériences de stimulation (impliquant une augmentation des taux de glucose du milieu environnant) effectuées aux jours 1, 8 et 26, les îlots encapsulés dans le gel de P(NIPAM-co-AA) sécrétaient des quantités semblables d'insuline en tout

temps alors que les îlots baignant dans une solution tampon sécrétaient 30% moins d'insuline au jour 26 qu'au jour 1.

#### *1.2.2.7.4 Poloxamer*

Les poloxamers sont des copolymères blocs de type ABA constitués d'unités de PEO (A) et de PPO (B). Le plus étudié est le poloxamer 407. Une solution concentrée de ce dernier (20-30% *p/p*) est liquide à température ambiante et gélifie à 37°C. Plusieurs applications ont été envisagées, mais celle ayant été la plus approfondie est l'administration de médicaments que ce soit par la voie topique (81-83), intra-musculaire (18, 84), intra-tumorale (85), rectale (86, 87), vaginale (88, 89) ou oculaire (90, 91). Par exemple, un gel à base de poloxamer 407 peut augmenter l'absorption d'un médicament au niveau oculaire (90): des essais chez le lapin ont montré qu'il était possible d'atteindre des niveaux de timolol dans l'humeur aqueuse deux fois plus élevés avec un gel de poloxamer qu'avec une solution (Fig. 1.12).

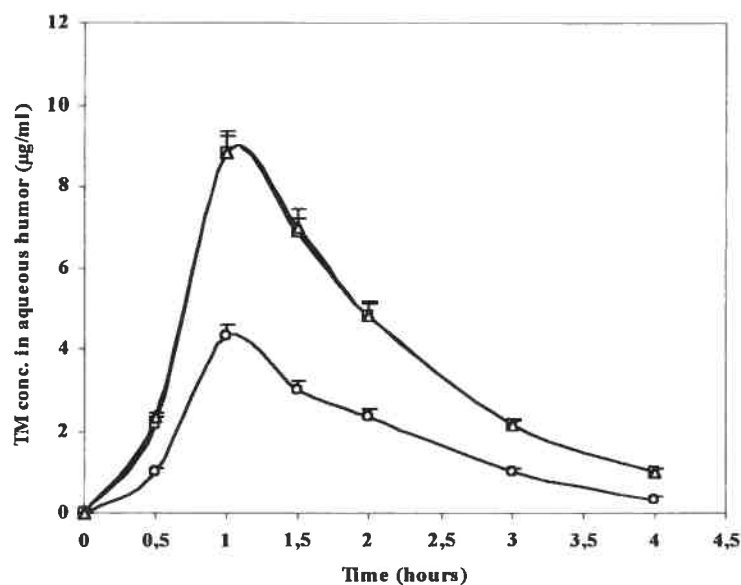


Figure 1.12 Concentration de timolol dans l'humeur aqueuse de lapin après instillation d'une solution aqueuse de timolol (cercle), d'une solution de poloxamer contenant du timolol (carré) et d'une solution de poloxamer/MC contenant du timolol (triangle). Tiré de (90).

Malgré le grand nombre d'études montrant le potentiel des solutions de poloxamer 407 pour l'administration prolongée de médicaments, il ne faut pas oublier qu'une concentration élevée de polymère est nécessaire à l'obtention d'une solution thermosensible. De plus, l'implant formé n'est pas biodégradable. Il faut également se rappeler que ce système ne permet qu'une libération de courte durée (quelques heures).

#### 1.2.2.7.5 Poloxamer et poly(acide acrylique) (PAA)

Le PAA de haute masse molaire est un polymère bioadhésif souvent utilisé pour augmenter le temps de contact d'un système avec son site d'application. Des copolymères greffés de PNIPAM et de PAA ayant des propriétés thermosensibles et bioadhésives ont d'abord été mis au point (92). Le



potentiel toxique du PNIPAM n'étant pas clairement établi, plusieurs chercheurs ont entrepris de créer des polymères semblables à base de poloxamer 407, un produit reconnu comme étant sécuritaire. Deux types de polymères ont été synthétisés: le PAA-g-poloxamer (93-95) et le poloxamer-g-PAA (96-98). Les solutions aqueuses de ceux-ci forment, à pH 7.4, un gel lorsque la température augmente de 4°C à 37°C. L'avantage de ces nouveaux systèmes est la faible concentration nécessaire pour obtenir une solution thermosensible comparativement au poloxamer. Leur côté bioadhésif (99) les destine à plusieurs voies d'administration (100-103). Des essais chez la brebis ont montré le potentiel du poloxamer-g-PAA (Smart Hydrogel™) pour l'administration vaginale d'estrogènes. Ce dernier prévenait l'écoulement post-administration, n'irritait pas la muqueuse vaginale et permettait d'atteindre des taux sanguins d'estradiol semblables à ceux obtenus avec la préparation commerciale Premarin® en utilisant une dose 5 fois plus faible (60 vs 300 µg) (101) (Fig. 1.13).

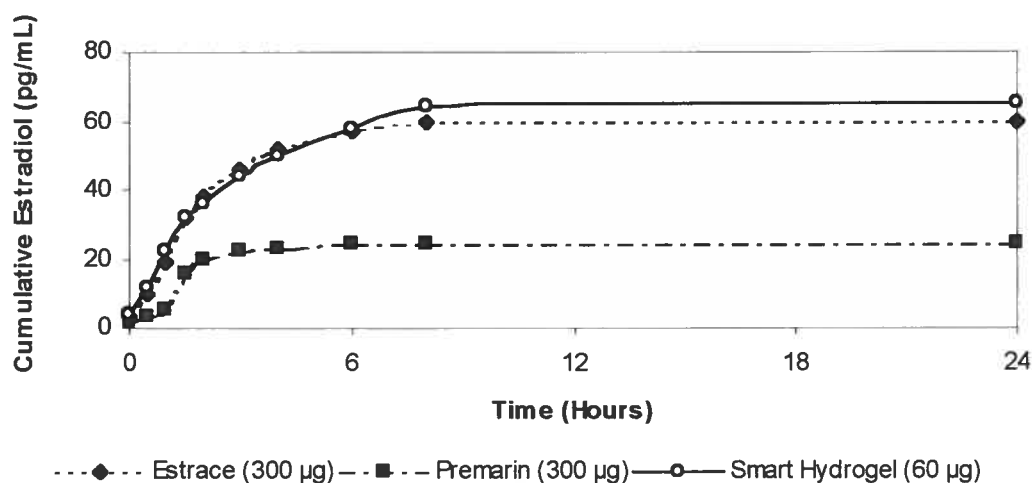


Figure 1.13 Taux sanguins d'estradiol après administration intra-vaginale chez la brebis de crème vaginale Estrace® (300 µg estradiol), de suppositoires vaginaux Premarin® (300 µg d'oestrogènes conjugués) et du Smart Hydrogel™ contenant 60 µg d'estradiol. Tiré de (101).

Des essais chez l'humain ont aussi permis de constater que, suite à une administration orale, une partie de la solution thermosensible demeurait au niveau de l'œsophage pour une période de temps prolongée (102). Il serait donc possible d'utiliser cette propriété pour protéger l'œsophage dans le traitement du reflux gastro-œsophagien.

#### 1.2.2.7.6 Copolymères de poly(oxyde d'éthylène) et poly(acide lactique)

Jeong *et al.* ont mis au point divers systèmes thermosensibles et biodégradables à base de PLA. Des copolymères tribloc PEO-PLGA-PEO (104, 105) ainsi que des copolymères peigne PEO-g-PLGA et PLGA-g-PEO (106-109) ont été synthétisés. Les solutions de ces polymères sont liquides à température ambiante et forment un gel transparent à 37°C; elles sont donc appropriées pour la mise au point de formes dépôt. Des études de libération *in vitro* avec deux molécules modèles, le kétoprofène (hydrophile) et la spironolactone (hydrophobe) ont révélé que le dépôt à base de PEO-PLGA-PEO permettait une libération sur 2 semaines (kétoprofène) ou 2 mois (spironolactone) selon la nature du médicament (110). La principale différence entre les systèmes réside dans leur vitesse de dégradation *in vivo*. Les dépôts de PEO-PLGA-PEO persistent au moins 1 mois au niveau du site d'injection, ceux à base de PLGA-g-PEO se dégradent en 3 mois environ alors que les formulations de PEO-g-PLGA se résorbent en moins d'une semaine. Ces différences permettent de moduler la durée de libération en mélangeant divers polymères. Des études chez le rat ont révélé qu'un dépôt à base de PEO-g-PLGA et de PLGA-g-PEO (50/50) contenant de l'insuline contrôlait la glycémie pendant 5 jours alors qu'un dépôt à base de PLGA-g-PEO seulement avait un effet pendant 16 jours (109).

Un autre copolymère à base de PEO et de PLGA a été développé par la compagnie MacroMed Inc. (111). Ce nouveau polymère (PLGA-PEO-PLGA), baptisé ReGel<sup>®</sup>, forme une solution liquide à une température inférieure à 15°C et

un gel à la température du corps. Ce dernier disparaît complètement du site d'injection en 4 à 6 semaines. L'application dont le développement est le plus avancé est l'utilisation de ReGel<sup>®</sup> pour l'administration intra-tumorale de paclitaxel (OncoGel<sup>®</sup>) (112). Ce dépôt permet une libération soutenue de paclitaxel *in vitro* et *in vivo* (suite à une injection intra-tumorale chez la souris). Une étude d'efficacité anticancéreuse a aussi montré que cette nouvelle formulation était plus efficace que le produit actuellement disponible sur le marché (Taxol<sup>®</sup>) dans un modèle de xénogreffe de tumeur mammaire humaine (MDA231).

#### 1.2.2.7.7 Liposomes thermosensibles

Une autre stratégie utilisée pour former un dépôt consiste à isoler les diverses composantes d'une réaction de complexation en encapsulant l'une d'elle dans des liposomes thermosensibles. Ce n'est que lorsque la température est augmentée suffisamment pour déstabiliser la membrane liposomale qu'il y a contact entre les divers éléments. Messersmith *et al.* ont étudié notamment un mélange d'alginate et de liposomes thermosensibles contenant du calcium (113). La préparation est demeurée liquide à la température ambiante mais a gélifié lorsque la température a été amenée à 37°C, suite à la libération des ions calcium à partir des liposomes (Fig. 1.14).

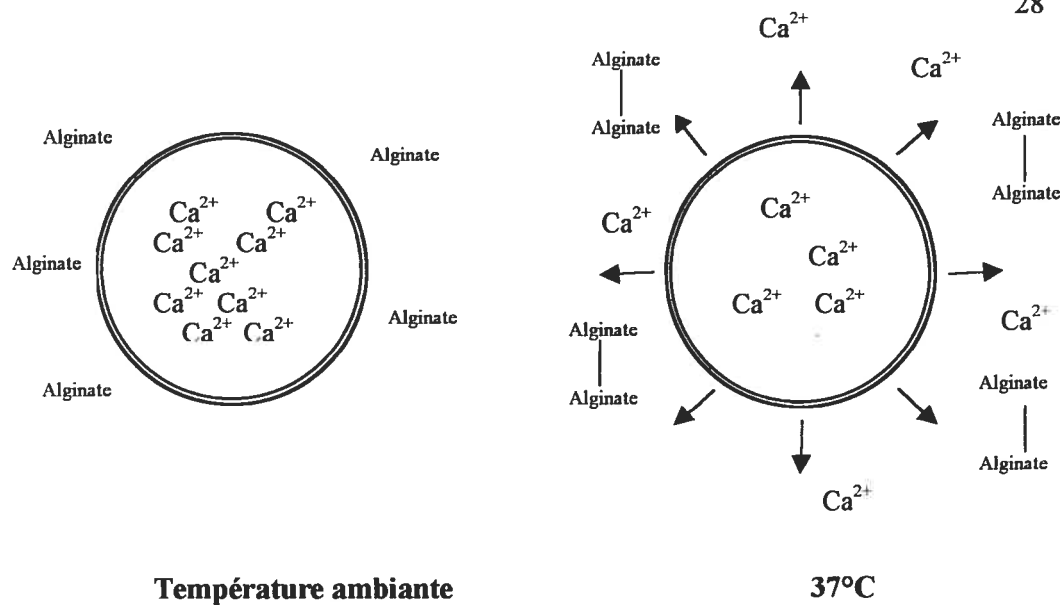


Figure 1.14 Réticulation de l'alginate à l'aide de liposomes thermosensibles.

Ce principe a été appliqué à d'autres systèmes; le calcium étant au centre de plusieurs réactions biologiques. Les liposomes thermosensibles de calcium ont été utilisés pour activer le facteur XIII, une enzyme transglutaminase (TGase) catalysant la formation du réseau de fibrine lors de la coagulation sanguine (113, 114) (Fig. 1.15).

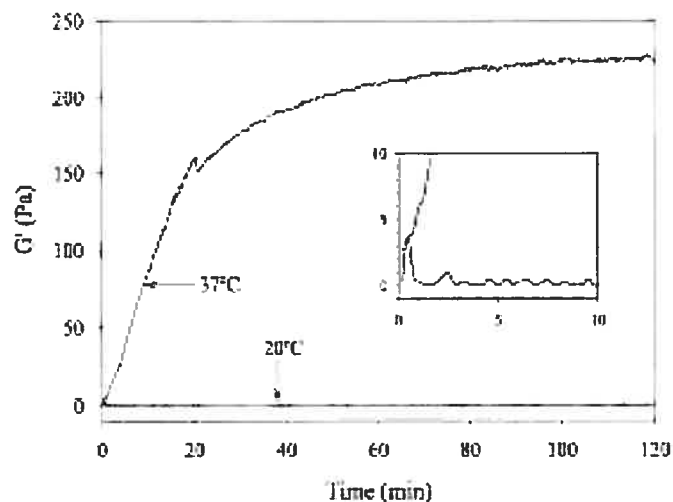


Figure 1.15 Gélification (augmentation du module élastique  $G'$ ) de la solution TGase/fibrinogène/liposomes thermosensibles contenant du calcium en fonction de la température. Tiré de (113).

#### 1.2.2.7.8 Chitosan et glycérophosphate

Une équipe de chercheurs de Montréal a récemment mis au point un système thermosensible à base de chitosan (115, 116). Ce dernier est un dérivé de la chitine, une des principales composantes de la carapace des crustacés. Le chitosan est soluble en milieu acide mais forme un précipité dès que le pH dépasse 6.2. Chenite *et al.* (115, 116) ont réussi à obtenir une solution de chitosan ayant un pH physiologique (7.4), tout en maintenant le chitosan en solution, en utilisant des sels de polyol. En plus, l'addition de ces sels rend la solution thermosensible. Celle-ci est liquide à la température ambiante et forme un gel à température corporelle. Ce système thermosensible constituait la base de mon projet de recherche.

## 1.3 Le chitosan et ses applications

### 1.3.1 Généralités

Chitosan est un nom qui désigne un groupe de polymères dérivés de la chitine. Cette dernière est une des principales composantes de la carapace des crustacés et c'est l'un des polysaccharides les plus abondants dans la nature (deuxième après la cellulose). Le chitosan est la forme partiellement désacétylée de la chitine. C'est un copolymère linéaire composé d'unités de glucosamine et de *N*-acétyl glucosamine liées par des liens  $\beta(1\rightarrow4)$  (Fig. 1.16). Même s'il n'y a pas de distinction claire entre la chitine et le chitosan, il est généralement accepté que la chitine est très acétylée alors que le chitosan est presque complètement désacétylé (>70%).

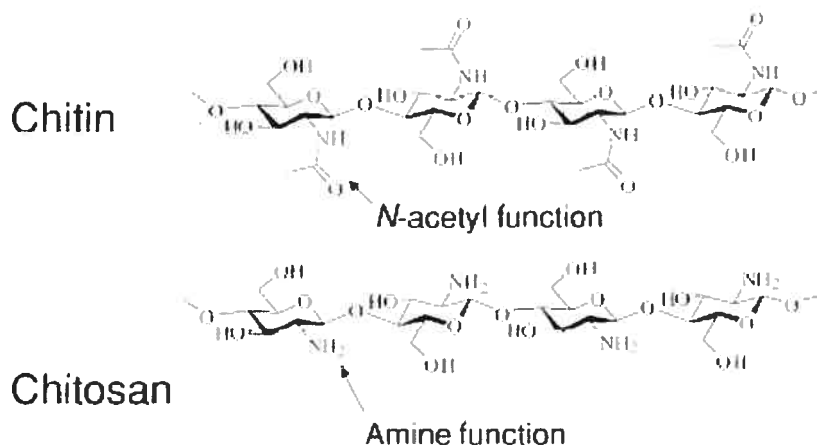


Figure 1.16 Structure chimique de la chitine et du chitosan.

La préparation du chitosan à partir de la chitine brute débute par l'élimination des protéines et des sels de calcium de l'exosquelette des crustacés à l'aide d'un traitement acide ou basique. Par exemple, l'hydroxyde de sodium (NaOH) peut être utilisé afin d'enlever les protéines et l'acide chlorhydrique

(HCl) pour supprimer le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Ensuite, la chitine est désacétylée à l'aide d'une solution basique concentrée (ex. NaOH). Ce processus entraîne l'hydrolyse des groupements aminoacétyles de la chitine. Le degré de désacétylation varie entre 70 et 95% selon la méthode utilisée. Pour la majorité des applications, le chitosan doit être purifié. On filtre donc le produit de base dissous dans une solution acide. La microfiltration est utilisée pour enlever les composés insolubles et l'ultrafiltration pour éliminer les composés de faible masse molaire. Le précipité est lavé et séché pour obtenir du chitosan sans amine libre. Lorsque le chitosan est destiné à un usage biomédical, le contenu en endotoxines est abaissé à un niveau acceptable pour l'utilisation du polymère chez l'humain. La Fig. 1.17 illustre les différentes étapes de la production du chitosan Protasan™ de la compagnie Pronova (117).

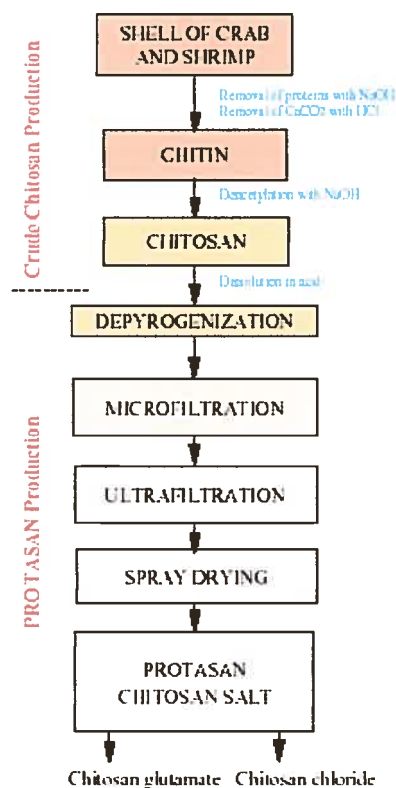


Figure 1.17 Préparation du chitosan à partir de la chitine. Tiré de (117).

Certaines caractéristiques du chitosan sont importantes à connaître lors de son acquisition car son comportement en est directement dépendant. Ces caractéristiques intrinsèques sont:

Sa composition. Les différents lots sont caractérisés par leur degré de désacétylation. Il s'agit du ratio entre les unités de glucosamine et de *N*-acétyl glucosamine. Il peut être déterminé, entre autres, par titrage, par RMN, par spectroscopie infrarouge ou ultraviolette. Il s'agit d'une des caractéristiques intrinsèques les plus importantes du chitosan. Il détermine le nombre de groupements amine libres dans la molécule.

Sa masse molaire moyenne. Elle se situe habituellement entre 10 000 et 1 000 000. Elle est déterminée à l'aide de mesures de viscosité intrinsèque, de mesures de diffusion de la lumière ou par chromatographie d'exclusion stérique.

D'autres caractéristiques générales sont aussi importantes à connaître avant d'utiliser ce polymère. Le chitosan est soluble en milieu acide mais insoluble à  $\text{pH} > 6$ . Pour cette raison, certains chitosans commerciaux contiennent une quantité stœchiométrique d'acide afin d'en permettre la dissolution dans l'eau. Il est également insoluble dans la majorité des solvants organiques. De plus, sa solubilité dépend en partie de sa masse molaire et de son degré de désacétylation. Par ailleurs, le chitosan est un polyélectrolyte à pH acide. En solution, il possède une charge positive à cause de la protonation du groupement amine de la glucosamine ( $\text{pK}_a$  apparent 6.5). Le polymère réagit donc avec les surfaces chargées négativement. Les groupements amine et hydroxyle du polymère peuvent être utilisés pour en modifier chimiquement les caractéristiques. Le chitosan présente également plusieurs propriétés biologiques. Voici quelques exemples d'applications illustrant la versatilité de ce polymère.



### 1.3.2 Chélation

Les propriétés de chélation du chitosan peuvent s'avérer intéressantes dans plusieurs domaines, en particulier pour la décontamination des eaux industrielles usées. On l'utilise en effet pour flocculer divers composés. Par exemple, lors d'un pré-traitement des eaux provenant d'une usine de liège, il a été employé afin d'améliorer le rendement de la filtration effectuée ensuite (118). De même, il a servi à retirer la kaolinite telle que retrouvée dans les eaux usées provenant d'usine d'argile (119). Le chitosan permet une floculation rapide de la kaolinite (Fig. 1.18). Les auteurs rapportent que la floculation et la décantation peuvent être effectuées en moins d'une heure.

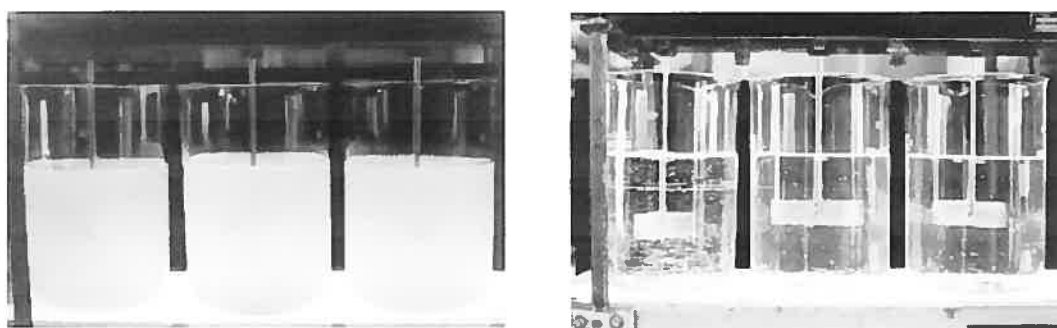


Figure 1.18 Suspension de kaolinite avant la floculation (gauche) et pendant la floculation (droite). Tiré de (119).

Des chercheurs thaïlandais l'ont également étudié pour l'adsorption des teintures dans les eaux usées des usines de textile (120). Ils ont mis au point un dérivé de chitosan très efficace pour décolorer les eaux usées. La décoloration atteignait 90% en moins de 10 minutes. De plus, le dérivé pouvait être régénéré et réutilisé au moins 10 fois. Le chitosan peut également servir à flocculer la vase lors de la préparation d'eau potable à partir des cours d'eau (121). D'autre part, il permet l'élimination des algues présentes dans les points d'eau décoratifs ou récréatifs (122). Le chitosan s'avère un choix intéressant pour ces applications car

il est moins toxique que les composés habituellement utilisés (ex: aluminium et calcaire) et il est biodégradable.

### **1.3.3 Traitement du papier**

Récemment, le potentiel du chitosan en tant que matériau pour améliorer la conservation du papier a été examiné (123). Des échantillons étaient recouverts d'un film de chitosan par trempage, soumis à un vieillissement accéléré (36, 72, 108 ou 144 h à 100°C) puis évalués à l'aide de divers tests. Le traitement à l'aide des solutions de chitosan a amélioré la résistance du papier au déchirement ainsi que sa durabilité.

### **1.3.4 Conservation des aliments**

L'utilisation du chitosan dans le secteur agroalimentaire a fait l'objet de plusieurs revues de littérature au cours des dernières années (124, 125). Dans ce domaine, il est souvent utilisé en tant qu'agent de conservation à cause de ses propriétés antimicrobiennes. En effet, le chitosan a une activité antibactérienne ou antifongique contre plusieurs microorganismes. L'activité antibactérienne du chitosan peut être bactéricide ou bactériostatique selon la souche bactérienne et les caractéristiques du polymère (125, 126). Le mécanisme exact de cette activité est encore inconnu mais différentes hypothèses ont été émises. Par exemple, il aurait un effet au niveau de la membrane des bactéries; il s'y lierait et affaiblirait sa capacité à agir comme barrière (127). L'activité antifongique du chitosan permet de réduire la croissance de nombreux pathogènes présents sur les fruits et les légumes suite à leur immersion dans une solution de celui-ci. Une équipe de chercheurs du Royaume-Uni l'a utilisé pour développer un nouveau système de conservation des saucisses de porc (128). Ce dernier permet de réduire les quantités de sulfites utilisées et ainsi se conformer aux nouvelles réglementations

en vigueur dans certains pays. Le chitosan est aussi utilisé sous forme de film pour la conservation des aliments. Ces films possèdent des propriétés similaires aux films plastiques tout en étant biodégradables. Ils se sont ainsi révélés très efficaces pour la conservation des mangues, prolongeant la période de conservation de 9 jours (129). De même, les films de chitosan ont permis de réduire la perte d'humidité, l'oxydation des lipides et la croissance microbienne lors de la conservation de filets de morue et de hareng (130). En application pré- et post-cueillette, le chitosan a entraîné une diminution du nombre de raisins infectés de moisissures ainsi que la sévérité des lésions lors de l'entreposage (131).

### 1.3.5 Applications biomédicales

Actuellement, le chitosan suscite beaucoup d'intérêt dans le domaine pharmaceutique et médical à cause de son caractère biocompatible et biodégradable. Néanmoins, les chercheurs continuent de se pencher sur l'épineuse question de la biocompatibilité lorsqu'ils mettent au point un nouveau système étant donné que le terme chitosan représente une grande famille de molécules ayant des propriétés variables. Diverses formes de chitosan (particules, films, implants) ont été évaluées suite à une administration orale, sous-cutanée, intramusculaire, intra-péritonéale ou intra-osseuse (132-136). Par exemple, l'étude de Hidaka *et al.* (133) a révélé que les membranes de chitosan implantées chez le rat causaient une inflammation dont l'intensité était inversement proportionnelle au degré de désacétylation. VandeVord *et al.* (134) ont obtenu des résultats similaires; leur implant fait de chitosan désacétylé à 92% a causé peu d'inflammation suite à l'implantation chez la souris. Pour ce qui est de la biodégradabilité des biomatériaux à base de chitosan, il a été remarqué qu'elle augmentait lorsque le degré de désacétylation diminuait (137).

### 1.3.5.1 Effet au niveau sanguin

Le chitosan et certains de ses dérivés ont un effet marqué au niveau de la coagulation sanguine. D'un côté, le chitosan est un bon agent hémostatique. Il augmente l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, un des premiers mécanismes activés lors d'un dommage tissulaire (138, 139) (Fig. 1.19). Il réduit également le temps de coagulation (139). D'un autre côté, certains dérivés sulfatés sont d'excellents anticoagulants (140). Des chercheurs ont ainsi mis au point un dérivé ayant une activité anticoagulante comparable à celle de l'héparine (141). De même, certains dérivés *N*-acylés pourraient servir à recouvrir la surface d'outils médicaux en contact avec le sang afin d'augmenter leur hémocompatibilité (142).

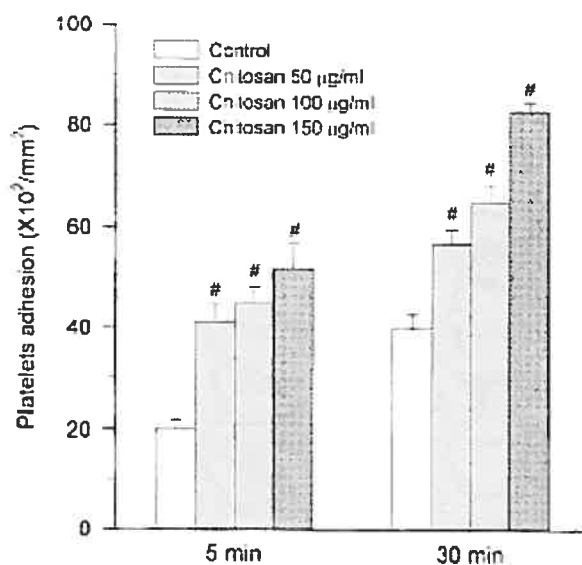


Figure 1.19 Adhésion plaquettaire en fonction de la concentration de chitosan et du temps de contact. Tiré de (138).

### 1.3.5.2 Traitement des plaies

Le chitosan agit à plusieurs niveaux au cours du processus de guérison et ces différents effets ont été revus par Ueno *et al.* (143). Le chitosan étant capable d'arrêter les saignements, il a d'abord été utilisé dans la fabrication de pansements. Plus tard, on s'est aperçu qu'il pouvait aussi accélérer la guérison des plaies. Les chercheurs l'utilisent habituellement en application topique, que ce soit sous forme de film (144) ou d'onguent (145). Un dérivé de chitosan formant un hydrogel lorsque exposé à des rayons UV a récemment été mis au point (voir section 1.2.2.1). Le gel formé couvre bien la plaie, maintient fermement ensemble deux morceaux de peau et accélère la fermeture des plaies. Afin d'augmenter l'efficacité du traitement, divers composés utiles à la guérison sont souvent incorporés dans la formulation. Par exemple, Mi *et al.* (146) ont développé un pansement multicouche à base de chitosan contenant un anti-infectieux (sulfadiazine d'argent). Ce pansement a une activité antimicrobienne contre le *Pseudomonas aeruginosa* et le *Staphylococcus aureus* pendant une semaine grâce à une libération prolongée de l'anti-infectieux (Fig. 1.20). Mizuno *et al.* (147) ont, quant à eux, incorporé un facteur de croissance des fibroblastes ("*basic fibroblast growth factor*") dans un film de chitosan afin d'accélérer le processus de guérison. De même, Ishihara *et al.* (39) ont ajouté différents facteurs de croissance et de l'héparine à un hydrogel de chitosan.

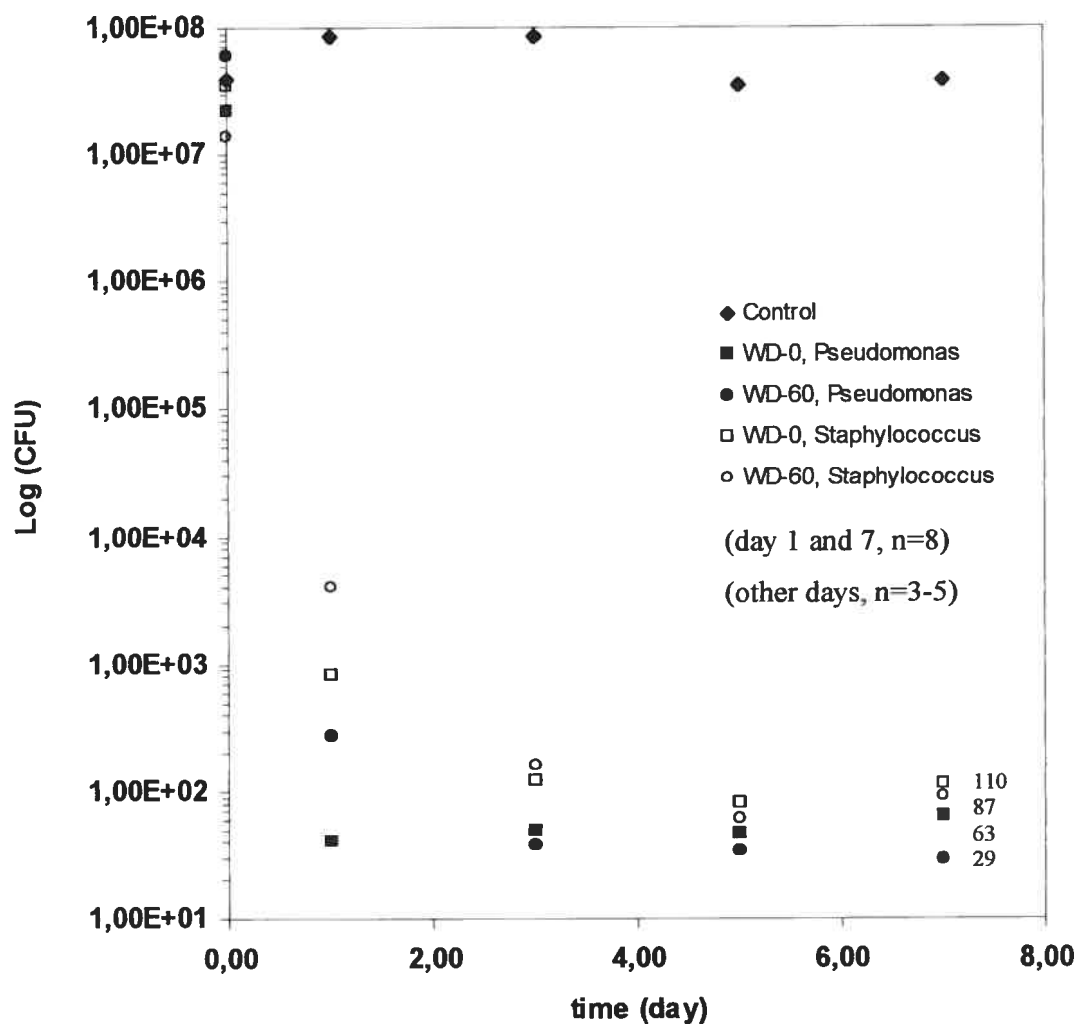


Figure 1.20 Colonies (CFU) de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues après biopsie d'une plaie infectée (rat) traitée ou non avec un pansement à base de chitosan contenant de la sulfadiazine d'argent. Tiré de (146).

### 1.3.5.3 Réparation tissulaire

Le chitosan a également fait l'objet d'investigation dans le domaine de la réparation tissulaire. Park *et al.* ont montré que des éponges à base de collagène et de chitosan pouvaient stimuler la régénération du tissu périodontal (148). Une équipe québécoise a, quant à elle, choisi d'utiliser le chitosan pour la fabrication *in vitro* d'équivalent cutané pouvant servir de greffe chez les grands brûlés (149-151) (Fig. 1.21). Lors d'essais chez la souris, il y a eu revascularisation, remodelage d'une matrice extracellulaire similaire au derme normal et régénération de fibres nerveuses.

Le chitosan est aussi employé dans la préparation de divers biomatériaux destinés à la réparation osseuse (152). Il a été mis en évidence que les ostéoblastes pouvaient proliférer dans les matériaux à base de chitosan et produire de la matrice osseuse (153). Par ailleurs, l'ostéogenèse était plus importante en présence de facteurs de croissance favorisant la régénération osseuse.

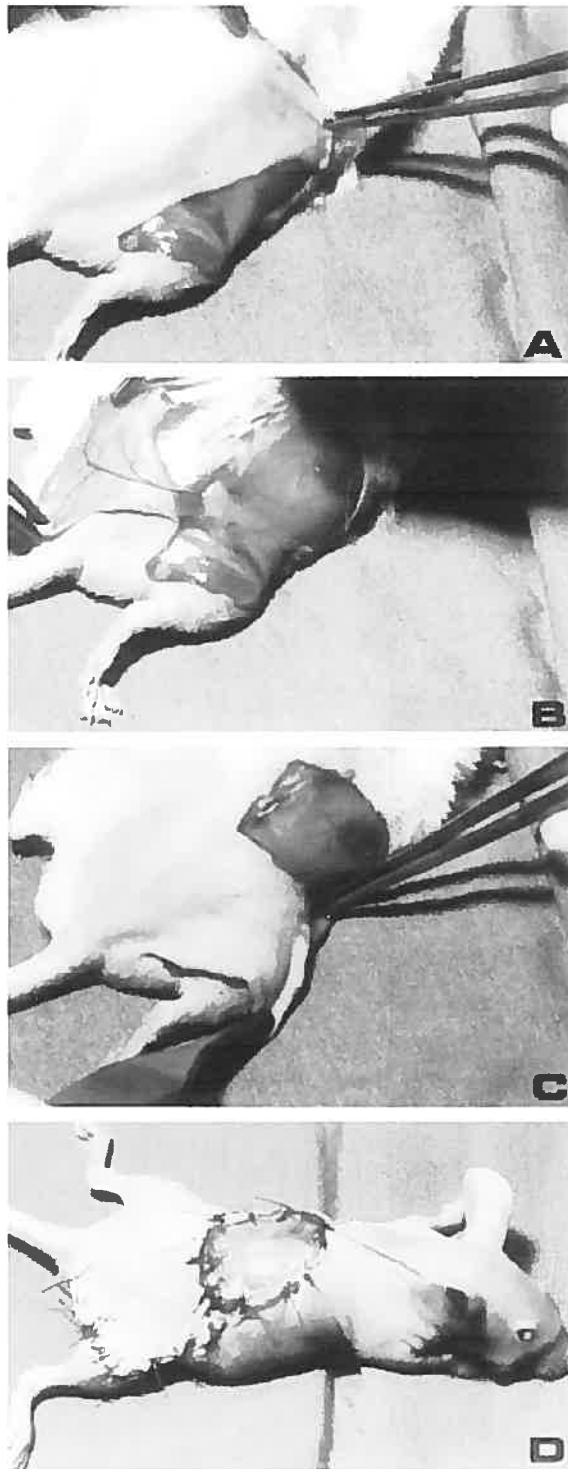


Figure 1.21 Une région de peau ( $2.5 \times 2.5\text{-cm}^2$ ) a été retirée puis un lambeau a été découpé (A). Ce dernier était bien vascularisé (B) et il a été positionné au dessus de la plaie (C). Les bords ont été cousus et la peau préparée *in vitro* a été greffée sur la plaie laissée par le lambeau (D). Tiré de (149).



#### 1.3.5.4 Effet sur les lipides circulants

Quelques travaux ont permis de mettre en évidence les propriétés hypocholestérolémiantes du chitosan. Par exemple, des chercheurs japonais ont administré du chitosan à des femmes en santé ayant une hypercholestérolémie légère à modérée afin de vérifier s'il permettait de réduire les taux de cholestérol sanguins alors que la diète n'était pas modifiée (154). Après 8 semaines de traitement, le chitosan a permis de diminuer de façon significative les taux de cholestérol ainsi que les taux de LDL ("*low density lipoproteins*", mauvais cholestérol). Les taux de triglycérides sont demeurés inchangés et les taux de HDL ("*high density lipoproteins*", bon cholestérol) ont légèrement diminué tout en restant dans les limites acceptables. L'effet hypocholestérolémiant du chitosan chez l'animal et chez l'humain est bien établi mais le mécanisme d'action reste encore à élucider. Une des hypothèses avancées est l'augmentation de l'excrétion fécale des acides biliaires. Plusieurs études ont montré que le chitosan adsorbait effectivement les acides biliaires. Un autre mécanisme suggéré est la réduction de l'absorption intestinale du cholestérol. La majorité des études *in vivo* appuient cette hypothèse (155).

#### 1.3.5.5 Effet sur les tumeurs

Il a été observé que le chitosan pouvait avoir des propriétés antitumorales. Nishimura *et al.* (156) ont montré que certains chitosans activaient les macrophages et supprimaient ainsi la croissance tumorale. De même, des polymères de faible masse molaire ont inhibé la croissance du sarcome 180 chez la souris après administration intra-péritonéale ou orale (157). De plus, certains oligosaccharides de chitosan exercent un effet inhibiteur sur la croissance des cellules tumorales Meth A ("*methylcholanthrene-induced fibrosarcoma A*") transplantées chez la souris (158, 159).

### 1.3.5.6 Administration des médicaments

Le domaine d'application où s'effectue présentement le plus de recherche sur le chitosan est l'administration de médicaments. Plusieurs revues de littérature ont été publiées au fil des ans à ce sujet (160-165). Certaines propriétés du chitosan sont particulièrement intéressantes pour cet usage. En effet, il a la capacité d'augmenter l'absorption au niveau des muqueuses en élargissant temporairement les jonctions entre les cellules épithéliales et son côté bioadhésif prolonge le temps de contact entre le véhicule et les tissus (166-174) (Fig. 1.22).

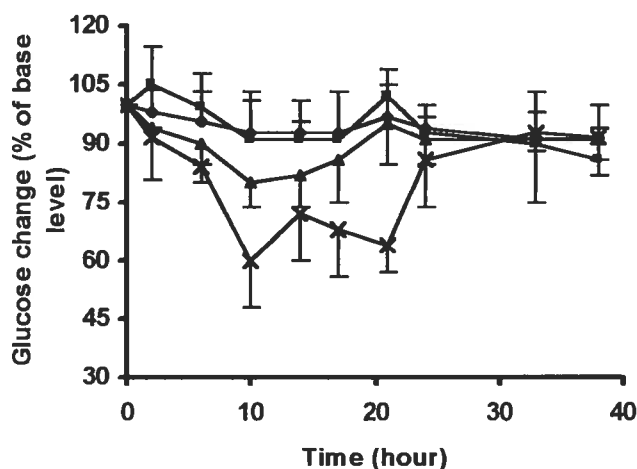


Figure 1.22 Effet hypoglycémique de diverses formulations d'insuline après administration orale chez des rats diabétiques. Solution saline (losange), solution d'insuline-chitosan (triangle), solution d'insuline (carré) ou nanoparticules d'insuline enrobées de chitosan (croix). Tiré de (169).

Le chitosan est utilisé pour la mise au point de véhicules destinés, entre autres, aux voies orale (167, 175, 176), nasale (170, 177-183), ophtalmique (168) ou intra-tumorale (184). Par exemple, Tozaki *et al.* (176) ont développé des capsules de chitosan permettant une libération d'acide 5-aminosalicylique préférentiellement au niveau du colon afin de traiter l'inflammation des colites ulcéreuses ou de la maladie de Crohn. Illum *et al.* (179, 180) ont mis au point des systèmes de libération intra-nasale de morphine à base de chitosan (solutions ou

poudres). Un de ces derniers a permis d'obtenir un soulagement environ 5 minutes après administration chez des patients cancéreux, ce qui est plus rapide qu'après administration orale. Un vaccin intra-nasal contre la diphtérie a aussi été développé (182). Une réponse immunitaire significative a été observée après administration nasale chez la souris de microsphères de chitosan contenant de la toxine diphtérique. Une étude effectuée récemment chez des volontaires sains a révélé qu'une seule administration intra-nasale était bien tolérée et qu'elle augmentait la capacité de neutralisation de la toxine (183). Cette capacité induite était équivalente à celle obtenue suite à une immunisation intra-musculaire standard. Il a également été démontré que l'administration intra-tumorale d'un photosensibilisateur, le vert d'indocyanine, dans un gel à base de chitosan augmentait la réponse tumorale au traitement par irradiation (184).

Le chitosan est également un vecteur prometteur pour la thérapie génique. En effet, lorsqu'il est en solution, sa charge positive lui permet de se lier à l'ADN chargé négativement. De plus, le chitosan est moins toxique que la plupart des vecteurs cationiques actuellement à l'étude. Köping-Höggård *et al.* (185) ont montré que le chitosan formait des complexes stables avec l'ADN et que cet arrangement protégeait l'ADN contre la dégradation dans le sérum. Kumar *et al.* (186) ainsi que Iqbal *et al.* (187) ont utilisé le chitosan pour développer un vaccin intra-nasal contre le virus respiratoire syncytial (VRS). Ce vaccin contient des nanosphères de chitosan et d'ADN (plasmides codant divers antigènes du VRS). Chez la souris, il a permis de réduire de façon significative les titres viraux et la charge d'antigènes viraux après une infection aiguë causée par le VRS. De plus, il y a eu une induction significative de la production d'anticorps.

## 1.4 But du projet

Le principal but de ce projet de recherche était d'évaluer le potentiel du nouveau système thermosensible à base de chitosan décrit au point 1.2.2.7.8 en tant que dépôt auto-formant permettant une libération prolongée de médicaments. Cette technologie fait partie des systèmes formant des implants au site d'injection présentés dans la revue de littérature au chapitre 2. Cette dernière est sous presse dans la revue *"European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics"*. Les chapitres suivants présentent les résultats obtenus. D'abord, le profil de libération de diverses macromolécules hydrosolubles à partir du gel a été étudié. Ces résultats ont été publiés dans la revue *"International Journal of Pharmaceutics"* en 2000 (chapitre 3). L'encapsulation des composés dans des liposomes avant incorporation dans le gel a ensuite été envisagée afin de ralentir leur libération. Les résultats de ces travaux sont parus dans la revue *"Journal of Controlled Release"* en 2002 (chapitre 4). Cette approche permettant effectivement de ralentir la libération des composés hydrosolubles, en particulier ceux de petite masse molaire, des essais avec un petit peptide appelé hexaréline ont été entrepris. Ces études n'ont pas été publiées et sont résumées au chapitre 5. Ces essais ont révélé que le système liposome-solution de chitosan thermosensible n'était pas approprié pour la libération prolongée d'un composé hydrosoluble dont le site d'action est éloigné du site d'injection puisque les taux plasmatiques étaient sous la limite de détection après 24 heures. Une application locale a alors été envisagée (injection intra-tumorale) et l'utilisation d'un composé hydrophobe (paclitaxel) a été explorée. Ces résultats ont été publiés dans la revue *"European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics"* en 2004 (chapitre 6). Ces derniers essais ont montré que le gel de chitosan pouvait libérer progressivement un composé hydrophobe sur une période de plus d'un mois. Des essais chez la souris ont également montré que l'injection intra-tumorale de cette nouvelle formulation permettait de ralentir la croissance tumorale.

## 1.5 Produits et méthodes

### 1.5.1 Produits

Nous nous sommes servis de différents chitosans au cours de ce travail. Pour les essais préliminaires, un chitosan de masse molaire moyenne (190 000-310 000) acheté chez Aldrich (Milwaukee, WI) a été employé. Par la suite, il a été remplacé par deux hydrochlorures de chitosan ultrapurs provenant de chez Pronova (Oslo, Norvège) (Protasan™). Ces derniers étaient purifiés pour une utilisation médicale et la forme hydrochlorure permettait de dissoudre la poudre directement dans l'eau. Enfin, un chitosan ultrapur (Ultrasan™) fourni par la compagnie BioSyntech Inc (Laval, QC) a été utilisé. Le chitosan de Aldrich avait un degré de désacétylation de 84%, un des hydrochlorures avait un degré de désacétylation de 84% (C84), l'autre de 95% (C95) et le chitosan de BioSyntech avait un degré de désacétylation de 95%. Lors des essais avec le chitosan de Aldrich, le glycérophosphate (GP) employé était un mélange 50:50 des isomères  $\beta$  et  $\alpha$ . Dans les autres essais, le GP contenait seulement l'isomère  $\beta$ . Les deux GP provenaient de chez Sigma (St-Louis, MO). Pour les études de libération *in vitro*, nous avons eu recours à plusieurs composés modèles. Le bleu de méthylène provenait de chez Fisher (Fairlawn, NJ). La calcéïne, le maléate de chlorphéniramine ainsi que les dextrans de masse molaire variable marqués à l'aide d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC-dextran) ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO). La carboxyfluorescéine (CF) a été obtenue chez Molecular Probes (Eugene, OR). Les autres molécules employées étaient l'hexaréline (peptide synthétique) (Europeptides, Argenteuil, France) et le paclitaxel (principe actif anti-cancéreux) (Bioxel Pharma, Ste-Foy, QC). Pour la préparation des liposomes, différents lipides ont été utilisés: phosphatidylcholine d'œuf (EPC), cholestérol (Chol), 1,2-dimyristol-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol (DMPG) et 1,2-distearoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (DSPC) (Northern Lipids, Vancouver, BC). Les cellules tumorales (EMT-6) ayant servi lors des essais avec

le paclitaxel ont été obtenues du Prof. Van Lier du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke.

### 1.5.2 Préparation de la solution thermosensible

Une solution de chitosan 1.8% (*p/p*) a d'abord été préparée par dissolution du polymère dans l'eau ou dans une solution d'acide acétique 0.1 M selon qu'il était sous la forme sel (hydrochlorure) ou non. Ensuite, une solution aqueuse de GP 45% (*p/p*) a été produite. Les deux solutions ont été refroidies à ~4°C dans un bain de glace puis la solution de GP a été ajoutée progressivement à la solution de chitosan sous agitation. La solution finale contenait 3.6 ou 7.3 % (*p/p*) de GP. Pour les essais *in vivo*, les solutions de chitosan et de GP ont été stérilisées respectivement par autoclave (121°C, 10 min) et par filtration. Les deux solutions ont ensuite été mélangées dans des conditions aseptiques. La formulation contenant du paclitaxel a été préparée en versant directement la solution de chitosan sur le principe actif stérilisé au préalable par irradiation gamma. Ce mélange a été agité pendant 4 heures avant que ne soit ajoutée la solution de GP.

### 1.5.3 Préparation des liposomes

Les liposomes ont été préparés par la technique "REV" ("*reverse-phase evaporation method*"). Les lipides dissous dans le chloroforme ou dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1 *v/v*) ont été déposés sur les parois d'un tube par évaporation. Le film de lipides a ensuite été dissous dans une phase organique (éther). La phase aqueuse contenant la molécule à incorporer (CF ou hexaréline) a ensuite été ajoutée. Le mélange a été mis dans un bain à ultrasons afin d'obtenir une émulsion homogène puis le solvant organique a été évaporé sous vide. Les préparations ont été soumises à la sonde à ultrasons ou extrudées afin d'obtenir une taille définie de liposomes. Les molécules non incorporées ont été séparées

des liposomes par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex G-100 ou G-50, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). La taille des liposomes a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière et la quantité de CF ou d'hexaréline incorporée dans les liposomes a été mesurée par spectrofluorométrie (Aminco-Bowman Series 2, Spectronics Instrument, Rochester, NY).

#### **1.5.4 Rhéologie**

Les études de rhéologie ont été effectuées à l'aide d'un rhéomètre Bohlin CVO (Bohlin Instruments, Cranbury, NJ) et de cylindres coaxiaux en mode oscillatoire sur des solutions thermosensibles fraîchement préparées contenant ou non des liposomes (chapitres 3 et 4). Les variations de module élastique ont été enregistrées en fonction du temps alors que le système était maintenu à  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . La fréquence d'oscillation était 1Hz tout au long de l'expérience.

#### **1.5.5 Stabilité des solutions thermosensibles**

La stabilité physique de deux solutions thermosensibles, l'une à base de C84 et l'autre à base d'un mélange 1:1 (*p/p*) de C84 et de C95 a été évaluée à l'aide de mesures rhéologiques (chapitre 3). Les solutions ont été entreposées à  $4^\circ\text{C}$  ou à la température ambiante. À différents temps, la viscosité a été déterminée à  $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$  avec un viscosimètre Brookfield RVDV-II+ (Brookfield Engineering Laboratories Inc, Stoughton, MA) équipé d'un cône-plan. À ces mêmes temps, la cinétique de gélification a été évaluée tel que décrit au point 1.5.4.

### 1.5.6 Études de libération *in vitro*

Les composés modèles, encapsulés ou non dans des liposomes, ont été mélangés à la solution thermosensible à température ambiante (chapitres 3, 4 et 5). Des échantillons (300 mg) de cette préparation ont été déposés dans les cellules de libération à flux continu (Fig. 1.23). La préparation thermosensible se trouvait dans la cupule au sommet du pied et un flux continu de tampon phosphate salin (PBS, pH 7.4) circulait au-dessus. La température des cellules a été maintenue à  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Le tampon sortant des cellules a été récupéré afin d'en doser le contenu en principe actif par spectrophotométrie, spectrofluorométrie ou à l'aide d'un essai radio-immunologique. Dans les études menées avec des liposomes (chapitre 4), la fluorescence de la CF a été mesurée avant et après l'ajout de Triton X-100. Ce dernier déstabilise les liposomes et permet la libération complète de leur contenu. Cette procédure permet de distinguer la CF libre de celle encapsulée dans les liposomes.

Lors des études avec le paclitaxel, les cellules de libération à flux continu n'ont pas été utilisées (chapitre 6). La solution thermosensible (300 mg) a été placée dans un moule puis dans un incubateur à  $37^\circ\text{C}$  pendant 12 heures. Les gels ont par la suite été démoulés et immergés dans 500 mL de PBS contenant 0.3 % (*p/v*) de lauryl sulfate de sodium (SDS) sous agitation (100 rpm) et à  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Des prélèvements ont été effectués à différents temps et le PBS renouvelé après chaque collecte. Le dosage du paclitaxel dans chaque échantillon a été réalisé par HPLC. L'analyse a été faite sur 55  $\mu\text{L}$  d'échantillon dilué dans une phase mobile composée d'acétonitrile, d'eau et de méthanol (48:41:11 *v/v*) à un débit de 1 mL/min (pompe Gilson modèle 302, Middleton, WI), avec une colonne Nova-Pak  $\text{C}_{18}$  4.6 x 150 mm (Waters, Milford, MA) et un détecteur UV (Gilson modèle 116, Middleton, WI) à 242 nm.



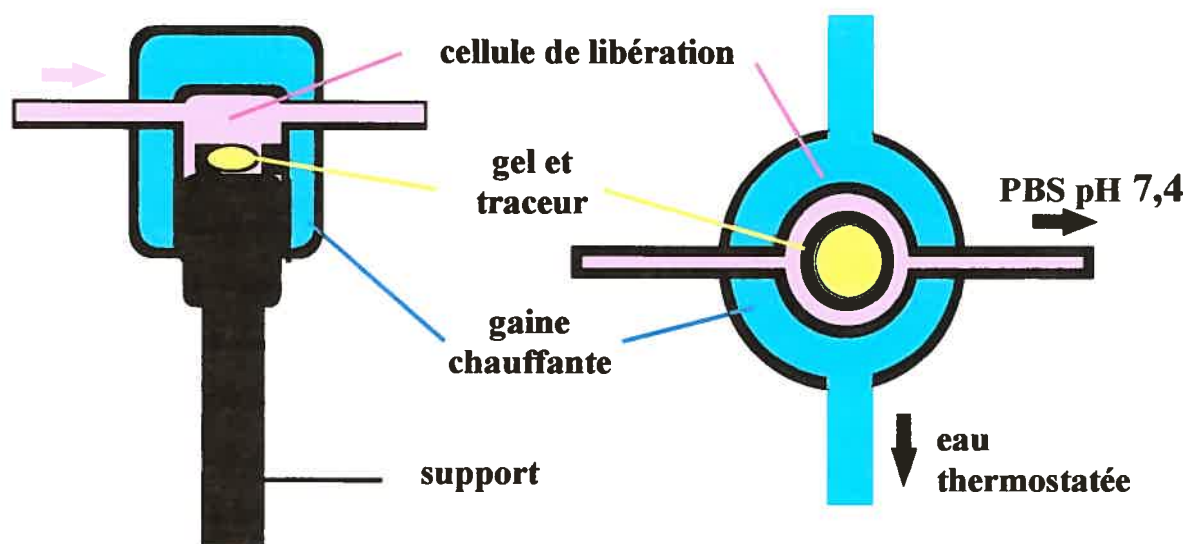


Figure 1.23 Cellule de libération à flux continu. Adapté de (188).

### 1.5.7 Érosion

Des échantillons de solutions thermosensibles ne contenant aucune molécule modèle ont été placés dans les cellules de libération à flux continu et soumis aux mêmes conditions que lors des études de libération. Après certains intervalles de temps, ils étaient récupérés, pesés, séchés pendant 48 heures et repesés (chapitre 3).

### 1.5.8 Microscopie électronique à balayage

Les premières images ont été prises sur des gels sans liposome (chapitre 3). Ces gels ont été soumis à la même procédure que lors des études d'érosion. A des temps prédéterminés, les échantillons étaient récupérés, congelés dans l'azote liquide puis lyophilisés pendant 48 heures. Ils ont ensuite été recouverts d'une mince couche d'or/palladium et examinés à l'aide d'un microscope électronique

Jeol JSM840 (Jeol, Boston, MA). Les images subséquentes ont été prises sur des gels contenant des liposomes fraîchement préparés (chapitre 4). Ceux-ci ont été observés par microscopie électronique à balayage (Jeol 100CX, Jeol, Peabody, MA) après cryofracture.

### 1.5.9 Activité anti-tumorale *in vivo*

Des souris Balb/c femelles pesant 15-17 g ont été utilisées (chapitre 6). Chaque animal a reçu  $2 \times 10^5$  cellules EMT-6 (cellules de carcinome mammaire murin) par voie sous-cutanée au niveau de la hanche. Dans la première étude, les souris ont été traitées lorsque la tumeur a atteint  $30 \text{ mm}^3$ , soit une taille suffisante permettant l'injection intra-tumorale. Dans la seconde, les souris ont été traitées 4 jours après l'inoculation des cellules tumorales. Ce moment a été choisi afin de mimer une faible population de cellules comme ce serait le cas après une chirurgie effectuée pour retirer une tumeur primaire. Dans chaque étude, les souris ont été réparties au hasard entre les 4 groupes suivants: salin intra-veineux  $200 \text{ }\mu\text{L/jour}$  pendant 4 jours, Taxol® intra-veineux  $10 \text{ mg/kg/jour}$  dans environ  $200 \text{ }\mu\text{L}$  pendant 4 jours, gel seul  $10 \text{ }\mu\text{L}$  intra-tumoral et gel contenant du paclitaxel  $10 \text{ }\mu\text{L}$  intra-tumoral (contenant l'équivalent de  $40 \text{ mg/kg}$  de paclitaxel). Les injections contrôles par voie intra-veineuse ont été réalisées sur 4 jours afin de simuler l'effet soutenu du gel. Le suivi consistait à mesurer la taille de la tumeur et le poids des souris afin de déterminer l'effet anti-tumoral et la toxicité systémique.

Après 17 jours d'observation, les animaux ont été sacrifiés et les tumeurs retirées. Elles ont été fixées dans de la formaline tamponnée pendant 2 semaines à  $4^\circ\text{C}$ . Chaque tumeur a ensuite été coupée en deux, une moitié a été fixée dans la paraffine puis des coupes de 5-6mm ont été réalisées. Une attention particulière a été portée aux tumeurs contenant du gel afin d'isoler la partie de tissus le contenant. Les coupes les plus intéressantes ont été colorées à l'aide de Saffranin-

O/Fast Green selon un procédé développé chez BioSyntech Inc. afin de visualiser les cellules tumorales viables et le gel de chitosan. Les coupes histologiques ont ensuite été examinées à l'aide d'un microscope (Olympus CX40, Carsen Group Inc., Markham, ON) équipé d'une caméra (Focus Corp., Séoul, Corée du Sud).

## 1.6 Bibliographie

1. R.N. Greenberg, Overview of patient compliance with medication dosing: A literature review, *Clin. Ther.* 6 (1984) 592-599.
2. A.J. Claxton, J. Cramer, C. Pierce, A systematic review of the association between dose regimens and medication compliance, *Clin. Ther.* 23 (2001) 1296-1310.
3. E. de Klerk, Patient compliance with enteric-coated weekly fluoxetine during continuation treatment of major depressive disorder, *J. Clin. Psychiatry.* 62 (2001) 43-47.
4. R. Judge, Patient perspectives on once-weekly fluoxetine, *J. Clin. Psychiatry.* 62 (2001) 53-57.
5. M.R. Kim, T.G. Park, Temperature-responsive and degradable hyaluronic acid/Pluronic composite hydrogels for controlled release of human growth hormone, *J. Controlled Release.* 80 (2002) 69-77.
6. K. Moriyama, N. Yui, Regulated insulin release from biodegradable dextran hydrogels containing poly(ethylene glycol), *J. Controlled Release.* 42 (1996) 237-248.
7. K. Aiedeh, E. Gianasi, I. Orienti, V. Zecchi, Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin, *J. Microencapsulation.* 14 (1997) 567-576.
8. Y.J. Kim, S. Choi, J.J. Koh, M. Lee, K.S. Ko, S.W. Kim, Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer, *Pharm. Res.* 18 (2001) 548-550.
9. C.I. Winternitz, J.K. Jackson, A.M. Oktaba, H.M. Burt, Development of a polymeric surgical paste formulation for taxol, *Pharm. Res.* 13 (1996) 368-375.
10. S.K. Dordunoo, A.M.C. Oktaba, W. Hunter, W. Min, T. Cruz, H.M. Burt, Release of taxol from poly( $\epsilon$ -caprolactone) pastes: effect of water-soluble additives, *J. Controlled Release.* 44 (1997) 87-94.
11. E.S. Park, M. Maniar, J.C. Shah, Biodegradable polyanhydride devices of cefazolin sodium, bupivacaine, and taxol for local drug delivery:

- preparation, and kinetics and mechanism of in vitro release, *J. Controlled Release*. 52 (1998) 179-189.
12. E. Harper, W. Dang, R.G. Lapidus, R.I. Garver, Enhanced efficacy of a novel controlled release paclitaxel formulation (PACLIMER delivery system) for local-regional therapy of lung cancer tumor nodules in mice, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 4242-4248.
  13. G.M. Jantzen, J.R. Robinson, Sustained- and controlled-release drug delivery systems, in: G.S. Banker and C.T. Rhodes (Eds.), *Modern Pharmaceutics*, Marcel Dekker, New York, 1996, p. 575-609.
  14. K. Mäder, B. Gallez, K.J. Liu, H.M. Swartz, Non-invasive in vivo characterization of release processes in biodegradable polymers by low frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Biomaterials*. 17 (1996) 457-461.
  15. K. Mäder, B. Bittner, Y. Li, W. Wohlauf, T. Kissel, Monitoring microviscosity and microacidity of the albumin microenvironment inside degrading microparticles from poly(lactide-*co*-glycolide) (PLG) or ABA-triblock polymers containing hydrophobic poly(lactide-*co*-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethyleneoxide) B blocks, *Pharm. Res.* 15 (1998) 787-793.
  16. A. Brunner, K. Mäder, A. Göpferich, pH and osmotic pressure inside biodegradable microspheres during erosion, *Pharm. Res.* 16 (1999) 847-853.
  17. A. Shenderova, T.G. Burke, S.P. Schwendeman, The acidic microclimate in poly(lactide-*co*-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins, *Pharm. Res.* 16 (1999) 241-248.
  18. M. Katakam, W.R. Ravis, A.K. Banga, Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamer gels, *J. Controlled Release*. 49 (1997) 21-26.
  19. M. Scherlund, A. Brodin, M. Malmsten, Nonionic cellulose ethers as potential drug delivery systems for periodontal anesthesia, *J. Colloid Interface Sci.* 229 (2000) 365-374.
  20. L. Zhang, D.L. Parsons, C. Navarre, U.B. Kompella, Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur, *J. Controlled Release*. 85 (2002) 73-81.

21. P. Couvreur, C. Dubernet, F. Puisieux, Controlled drug delivery with nanoparticles: Current possibilities and future trends, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1995) 2-13.
22. A. Zimmer, J. Kreuter, Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16 (1995) 61-73.
23. J.M. Anderson, M.S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28 (1997) 5-24.
24. K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, K.M. Shakesheff, Polymeric systems for controlled drug release, *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181-3198.
25. R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials.* 21 (2000) 2475-2490.
26. E. Alléman, R. Gurny, E. Doelker, Drug-loaded nanoparticles - Preparation methods and drug targeting issues, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39 (1993) 173-191.
27. H. Okada, Y. Doken, Y. Ogawa, H. Toguchi, Sustained suppression of the pituitary-gonadal axis by leuporelin three-month depot microspheres in rats and dogs, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1199-1203.
28. B. Bittner, M. Morlock, H. Koll, G. Winter, T. Kissel, Recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: influence of the encapsulation technique and polymer purity on microsphere characteristics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 295-305.
29. S. Calis, R. Jeyanthi, T. Tsai, R.C. Mehta, P.P. DeLuca, Adsorption of salmon calcitonin to PLGA microspheres, *Pharm. Res.* 12 (1995) 1072-1076.
30. R.V. Diaz, M. Llabres, C. Evora, One-month sustained release microspheres of I-bovine calcitonin. In vitro-in vivo studies, *J. Controlled Release.* 59 (1999) 55-62.
31. A. Hagiwara, C. Sakakura, M. Shirasu, J. Yamasaki, T. Togawa, T. Takahashi, S. Muranishi, S.H. Hyon, Y. Ikada, Therapeutic effects of 5-fluorouracil microspheres on peritoneal carcinomatosis induced by colon 26 or B-16 melanoma in mice, *Anticancer Drugs.* 9 (1998) 287-289.

32. R.T. Liggins, S. D'Amours, J.S. Demetrick, L.S. Machan, H.M. Burt, Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres for the prevention of intraperitoneal carcinomatosis after a surgical repair and tumor cell spill, *Biomaterials*. 21 (2000) 1959-1969.
33. L. Mu, S.S. Feng, Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers, *J. Controlled Release*. 76 (2001) 239-254.
34. X.M. Lam, E.T. Duenas, A.L. Daugherty, N. Levin, J.L. Cleland, Sustained release of recombinant human insulin-like growth factor-I for treatment of diabetes, *J. Controlled Release*. 67 (2000) 281-292.
35. K. Tokuda, S. Natsugoe, M. Shimada, T. Kumanohoso, M. Baba, S. Takao, K. Nakamura, K. Yamada, H. Yoshizawa, Y. Hatate, T. Aikou, Design and testing of a new cisplatin form using a base material by combining poly-d,l-lactic acid and polyethylene glycol acid against peritoneal metastasis, *Int. J. Pharm.* 76 (1998) 709-712.
36. Y. An, J.A. Hubbell, Intraarterial protein delivery via intimately-adherent bilayer hydrogels, *J. Controlled Release*. 64 (2000) 205-215.
37. K. Ono, Y. Saito, H. Yura, K. Ishikawa, A. Kurita, T. Akaike, M. Ishihara, Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive, *J. Biomed. Mater. Res.* 49 (2000) 289-295.
38. M. Ishihara, K. Nakanishi, K. Ono, M. Sato, M. Kikuchi, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Uenoyama, A. Kurita, Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, *Biomaterials*. 23 (2002) 833-840.
39. M. Ishihara, K. Obara, T. Ishizuka, M. Fujita, M. Sato, K. Masuoka, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Kikuchi, A. Kurita, Controlled release of fibroblast growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and subsequent effect on in vivo vascularization, *J. Biomed. Mater. Res.* 64A (2002) 551-559.
40. K. Obara, M. Ishihara, T. Ishizuka, M. Fujita, Y. Ozeki, T. Maehara, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Kikuchi, A. Kurita, Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-

- 2 stimulates wound healing in healing-impaired *db/db* mice, *Biomaterials*. 24 (2003) 3437-3444.
41. R.L. Dunn, J.P. English, D.R. Cowsar, D.P. Vanderbilt, Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, U. S. Patent 4, 938, 763 (1990).
  42. M.L. Shively, B.A. Coonts, W.D. Renner, J.L. Southard, A.T. Bennett, Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system, *J. Controlled Release*. 33 (1995) 237-243.
  43. R.E. Eliaz, J. Kost, Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins, *J. Biomed. Mater. Res*. 50 (2000) 388-396.
  44. R.E. Eliaz, F.C. Szoka, Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants, *Gene Ther*. 9 (2002) 1230-1237.
  45. B.O. Haglund, R. Joshi, K.J. Himmelstein, An in situ gelling system for parenteral delivery, *J. Controlled Release*. 41 (1996) 229-235.
  46. F.W. Okumu, L.N. Dao, P.J. Fielder, N. Dvbdal, D. Brooks, S. Sane, J.L. Cleland, Sustained delivery of human growth hormone from a novel gel system: SABER, *Biomaterials*. 23 (2002) 4353-4358.
  47. D.J. Abdallah, R.G. Weiss, Organogels and low molecular mass organic gelators, *Adv. Mater*. 12 (2000) 1237-1246.
  48. D.M. Wyatt, D. Dorschel, A cubic-phase delivery system composed of glyceryl monooleate and water for sustained release of water-soluble drugs, *Pharm. Technol*. October (1992) 116-130.
  49. O. Gronwald, E. Snip, S. Shinkai, Gelators for organic liquids based on self-assembly: a new facet of supramolecular and combinatorial chemistry, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci*. 7 (2002) 148-156.
  50. S. Murdan, G. Gregoriadis, A.T. Florence, Novel sorbitan monostearate organogels, *J. Pharm. Sci*. 88 (1999) 608-614.
  51. S. Murdan, B. van der Bergh, G. Gregoriadis, A.T. Florence, Water-in-sorbitan monostearate organogels (water-in-oil gels), *J. Pharm. Sci*. 88 (1999) 615-619.
  52. A.C. Couffin-Hoarau, A. Motulsky, P. Delmas, J.C. Leroux, In situ-forming pharmaceutical organogels based on the self-assembly of L-alanine derivatives, *Pharm. Res*. 21 (2004) 454-457.



53. J.C. Shah, Y. Sadhale, D.M. Chilukuri, Cubic phase gels as drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 229-250.
54. S.J. de Jong, S.C. De Smedt, J. Demeester, C.F. van Nostrum, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink, Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted to dextran, *J. Controlled Release*. 72 (2001) 47-56.
55. S.J. de Jong, S.C. De Smedt, M.W.C. Wahls, J. Demeester, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink, Novel self-assembled hydrogels by stereocomplex formation in aqueous solution of enantiomeric lactic acid oligomers grafted to dextran, *Macromolecules*. 33 (2000) 3680-3686.
56. S.J. de Jong, B. van Eerdenbrugh, C.F. van Nostrum, J.J. Kettenes-van den Bosch, W.E. Hennink, Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior, *J. Controlled Release*. 71 (2001) 261-275.
57. S. Li, M. Vert, Synthesis, characterization, and stereocomplex-induced gelation of block copolymers prepared by ring-opening polymerization of L(D)-lactide in the presence of poly(ethylene glycol), *Macromolecules*. 36 (2003) 8008-8014.
58. A. Rozier, C. Mazuel, J. Grove, B. Plazonnet, Gelrite : A novel, ion-activated, in-situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 163-168.
59. S. Cohen, E. Lobel, A. Trevigoda, Y. Peled, A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye, *J. Controlled Release*. 44 (1997) 201-208.
60. S. Kumar, B.O. Haglund, K.J. Himmelstein, In situ-forming gels for ophthalmic drug delivery, *J. Ocular Pharmacol.* 10 (1994) 47-56.
61. B. Srividya, R.M. Cardoza, P.D. Amin, Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system, *J. Controlled Release*. 73 (2001) 205-211.
62. E. Heymann, Studies on sol-gel transformations. I. The inverse sol-gel transformation of methylcellulose in water, *Trans. Faraday Soc.* 31 (1935) 846-864.
63. N. Sarkar, Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropyl methylcellulose, *J. Appl. Polym. Sci.* 24 (1979) 1073-1087.

64. M.C. Tate, D.A. Shear, S.W. Hoffman, D.G. Stein, M.C. LaPlaca, Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury, *Biomaterials*. 22 (2001) 1113-1123.
65. A. Carlsson, G. Karlström, B. Lindman, O. Stenberg, Interaction between ethyl(hydroxyethyl)cellulose and sodium dodecyl sulphate in aqueous solution, *Colloid Polym. Sci.* 266 (1988) 1031-1036.
66. A. Carlsson, G. Karlström, B. Lindman, Thermal gelation of nonionic cellulose ethers and ionic surfactants in water, *Colloids Surf.* 47 (1990) 147-165.
67. M. Shirakawa, K. Yamatoya, K. Nishinari, Tailoring xyloglucan properties using an enzyme, *Food Hydrocolloids*. 12 (1998) 25-28.
68. S. Miyazaki, F. Suisha, N. Kawasaki, M. Shirakawa, K. Yamatoya, D. Attwood, Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery, *J. Controlled Release*. 56 (1998) 75-83.
69. F. Suisha, N. Kawasaki, S. Miyazaki, M. Shirakawa, K. Yamatoya, M. Sasaki, D. Attwood, Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C, *Int. J. Pharm.* 172 (1998) 27-32.
70. N. Kawasaki, R. Ohkura, S. Miyazaki, Y. Uno, S. Sugimoto, D. Attwood, Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery, *Int. J. Pharm.* 181 (1999) 227-234.
71. S. Miyazaki, N. Kawasaki, K. Endo, D. Attwood, Oral sustained delivery of theophylline from thermally reversible xyloglucan gels in rabbits, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 1185-1191.
72. S. Miyazaki, S. Suzuki, N. Kawasaki, K. Endo, A. Takahashi, D. Attwood, In situ gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride, *Int. J. Pharm.* 229 (2001) 29-36.
73. A. Takahashi, S. Suzuki, N. Kawasaki, W. Kubo, S. Miyazaki, R. Loeberberg, J. Bachynsky, D. Attwood, Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from in situ gelling xyloglucan formulations in rats, *Int. J. Pharm.* 246 (2002) 179-186.

74. C.K. Han, Y.H. Bae, Inverse thermally-reversible gelation of aqueous *N*-isopropylacrylamide copolymer solutions, *Polymer*. 39 (1998) 2809-2814.
75. B. Vernon, A. Gutowska, S.W. Kim, Y.H. Bae, Thermally reversible polymer gels for biohybrid artificial pancreas, *Macromol. Symp.* 109 (1996) 155-167.
76. Y.H. Bae, B. Vernon, C.K. Han, S.W. Kim, Extracellular matrix for a rechargeable cell delivery system, *J. Controlled Release*. 53 (1998) 249-258.
77. B. Vernon, S.W. Kim, Y.H. Bae, Insulin release from islets of Langerhans entrapped in a poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylic acid) polymer gel, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 10 (1999) 183-198.
78. H. Gappa, M. Baudys, J.J. Koh, S.W. Kim, Y.H. Bae, The effect of zinc-crystallized glucagon-like peptide-1 on insulin secretion of macroencapsulated pancreatic islets, *Tissue Eng.* 7 (2001) 35-44.
79. S.Y. Chae, S.W. Kim, Y.H. Bae, Effects of cross-linked hemoglobin on functionality and viability of microencapsulated pancreatic islets, *Tissue Eng.* 8 (2002) 379-394.
80. S.Y. Chae, S.W. Kim, Y.H. Bae, Bioactive polymers for biohybrid artificial pancreas, *J. Drug Targeting*. 9 (2001) 473-484.
81. S. Miyazaki, S. Takeuchi, C. Yokouchi, M. Takada, Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical administration of anticancer agents, *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 4205-4208.
82. S.C. Shin, C.W. Cho, I.J. Oh, Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats, *Int. J. Pharm.* 193 (2000) 213-218.
83. J. Liaw, Y.C. Lin, Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl, *J. Controlled Release*. 68 (2000) 273-282.
84. T.P. Johnston, S.C. Miller, Inulin disposition following intramuscular administration of an inulin/poloxamer gel matrix, *J. Parent. Sci. Technol.* 43 (1989) 279-286.
85. M.M. Amiji, P.K. Lai, D.B. Shenoy, M. Rao, Intratumoral administration of paclitaxel in an in situ gelling poloxamer 407 formulation, *Pharm. Dev. Tech.* 7 (2002) 195-202.

86. H.G. Choi, J.H. Jung, J.M. Ryu, S.J. Yoon, Y.K. Oh, C.K. Kim, Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository, *Int. J. Pharm.* 165 (1998) 33-44.
87. J.M. Ryu, S.J. Chung, M.H. Lee, C.K. Kim, C.K. Shim, Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum, *J. Controlled Release*. 59 (1999) 163-172.
88. J.Y. Chang, Y.K. Oh, H.G. Choi, Y.B. Kim, C.K. Kim, Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginals gels in physiological conditions, *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 155-163.
89. J.Y. Chang, Y.K. Oh, H.S. Kong, E.J. Kim, D.D. Jang, K.T. Nam, C.K. Kim, Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis, *J. Controlled Release*. 82 (2002) 39-50.
90. A.H. El-Kamel, In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate, *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 47-55.
91. G. Wei, H. Xu, P.T. Ding, S.M. Li, J.M. Zheng, Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies, *J. Controlled Release*. 83 (2002) 65-74.
92. G. Chen, A.S. Hoffman, Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transition over a wide range of pH, *Nature*. 373 (1995) 49-52.
93. A.S. Hoffman, G. Chen, S. Kaang, D.T. Priebe, New bioadhesive polymer compositions for prolonged drug release in the eye, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22 (1995) 159-160.
94. A.S. Hoffman, G. Chen, X. Wu, Z. Ding, B. Kabra, K. Randeri, M. Schiller, E. Ron, N. Peppas, C. Brazel, Graft copolymers of PEO-PPO-PEO triblock polyethers on bioadhesive polymer backbones: Synthesis and properties, *Polym. Prepr.* 38 (1997) 524-525.
95. G. Chen, A.S. Hoffman, Block and graft copolymers and methods relating thereto, U.S. Patent 6,486,213 (2002).
96. L. Bromberg, Novel family of thermogelling materials via C-C bonding between poly(acrylic acid) and poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide), *J. Phys. Chem. B*. 102 (1998) 1956-1963.

97. L. Bromberg, Polyether-modified poly(acrylic acid): Synthesis and applications, *Ind. Eng. Chem. Res.* 37 (1998) 4267-4274.
98. L. Bromberg, E.C. Lupton, M.E. Schiller, M.J. Timm, G. McKinney, Responsive polymer networks and methods of their use, U.S. Patent 5,939,485 (1999).
99. L.E. Bromberg, M.J. Orkisz, E.S. Ron, Bioadhesive properties of polyethylene-*b*-polyoxypropylene-*b*-polyoxyethylene-*g*-poly(acrylic acid) polymers (Smart Hydrogel<sup>TM</sup>), *Polym. Prepr.* 38 (1997) 626-627.
100. E.S. Ron, E.J. Roos, A.K. Staples, L.E. Bromberg, M.E. Schiller, Interpenetrating polymer networks for sustained dermal delivery, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 23 (1996) 128-129.
101. E.S. Ron, L. Bromberg, S. Luczak, M. Kearney, D. Deaver, M. Schiller, Smart Hydrogel: A novel mucosal delivery system, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioactiv. Mater.* 24 (1997) 407-408.
102. A.M. Potts, S. Jackson, N. Washington, P. Gilchrist, E.S. Ron, M. Schiller, C.G. Wilson, In vivo determination of the oesophageal retention of Smart Hydrogel, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24 (1997) 335-336.
103. L.E. Bromberg, T.H.E. Mendum, M.J. Orkisz, M.E. Schiller, E.C. Lupton, E.S. Ron, Polyoxyethylene-*b*-polyoxypropylene-*b*-polyoxyethylene-*g*-poly(acrylic acid) polymers (Smart Hydrogel<sup>TM</sup>) as a carrier in controlled delivery of proteins and peptides, *Polym. Prepr.* 38 (1997) 602-603.
104. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions, *Macromolecules.* 32 (1999) 7064-7069.
105. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 16 (1999) 185-193.
106. B. Jeong, M.R. Kibbey, J.C. Birnbaum, Y.Y. Won, A. Gutowska, Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-*g*-PLGA, *Macromolecules.* 33 (2000) 8317-8322.
107. B. Jeong, L.Q. Wang, A. Gutowska, Biodegradable thermoreversible gelling PLGA-*g*-PEG copolymers, *Chem. Commun.* (2001) 1516-1517.

108. Y.M. Chung, K.L. Simmons, A. Gutowska, B. Jeong, Sol-gel transition temperature of PLGA-g-PEG aqueous solutions, *Biomacromolecules*. 3 (2002) 511-516.
109. B. Jeong, K.M. Lee, A. Gutowska, Y.H. An, Thermogelling biodegradable copolymer aqueous solutions for injectable protein delivery and tissue engineering, *Biomacromolecules*. 3 (2002) 865-868.
110. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, *J. Controlled Release*. 63 (2000) 155-163.
111. R.C. Rath, G.M. Zentner, Biodegradable low molecular weight triblock poly(lactide-co-glycolide) polyethylene glycol copolymers having reverse thermal gelation properties, U.S. Patent 6,004,573 (1999).
112. G.M. Zentner, R. Rath, C. Shih, J.C. McRea, M.H. Seo, H. Oh, B.G. Rhee, J. Mestecky, Z. Moldoveanu, M. Morgan, S. Weitman, Biodegradable block copolymers for drug delivery of proteins and water-insoluble drugs, *J. Controlled Release*. 72 (2001) 203-215.
113. E. Westhaus, P.B. Messersmith, Triggered release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogel, *Biomaterials*. 22 (2001) 453-462.
114. E. Westhaus, P.B. Messersmith, Thermally triggered enzymatic crosslinking of proteins for in-situ gelation, *Trans. Soc. Biomat.* 25<sup>th</sup> Annual Meeting (1999) 247.
115. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials*. 21 (2000) 2155-2161.
116. A. Chenite, M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput, N. Kandani, Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydr. Polymers*. 46 (2001) 39-47.
117. O. Skaugrud, A. Hagen, B. Borgersen, M. Dornish, *Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan*, 1998, Pronova Biomedicals, Oslo, Norway.

118. M. Minhalma, M.N. De Pinho, Flocculation/flotation/ultrafiltration integrated process for the treatment of cork processing wastewaters, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 4916-4921.
119. R. Divakaran, V.N.S. Pillai, Flocculation of kaolinite suspensions in water by chitosan, *Wat. Res.* 35 (2001) 3904-3908.
120. T.S. Trung, C.H. Ng, W.F. Stevens, Characterization of decrystallized chitosan and its application in biosorption of textiles dyes, *Biotechnol. Lett.* 25 (2003) 1185-1190.
121. R. Divakaran, V.N.S. Pillai, Flocculation of river silt using chitosan, *Wat. Res.* 36 (2002) 2414-2418.
122. R. Divakaran, V.N.S. Pillai, Flocculation of algae using chitosan, *J. Appl. Phycol.* 14 (2002) 419-422.
123. A.H. Basta, The role of chitosan in improving the ageing resistance of rosin sized paper, *Restaurator.* 24 (2003) 106-117.
124. F. Shahidi, J.K.V. Arachchi, Y.J. Jeon, Food applications of chitin and chitosans, *Trends Food Sci. Technol.* 10 (1999) 37-51.
125. C. Muzzarelli, R.A.A. Muzzarelli, Chitin related food science today (and two centuries ago), *Agro Food Ind. Hi Tec.* 14 (2003) 39-42.
126. H.K. No, N.Y. Park, S.H. Lee, S.P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *Int. J. Food Microbiol.* 74 (2002) 65-72.
127. I.M. Helander, E.L. Nurmiaho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller, Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria, *Int. J. Food Microbiol.* 71 (2001) 235-244.
128. S. Roller, S. Sagoo, R. Board, T. O'Mahony, E. Caplice, G. Fitzgerald, M. Fogden, M. Owen, H. Fletcher, Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages, *Meat Sci.* 62 (2002) 165-177.
129. P.C. Srinivasa, R. Baskaran, M.N. Ramesh, K.V. Harish Prashanth, R.N. Tharanathan, Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film, *Eur. Food Res. Technol.* 215 (2002) 504-508.
130. Y.J. Jeon, J.Y.V.A. Kamil, F. Shahidi, Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and atlantic cod, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5167-5178.

131. G. Romanazzi, F. Nigro, A. Ippolito, D. Di Venere, M. Salerno, Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes, *J. Food Sci.* 67 (2002) 1862-1867.
132. Y. Tanaka, S. Tanioka, M. Tanaka, T. Tanigawa, Y. Kitamura, S. Minami, Y. Okamoto, M. Miyashita, M. Nanno, Effects of chitin and chitosan particules on BALB/c mice by oral and parenteral administration, *Biomaterials*. 18 (1997) 591-595.
133. Y. Hidaka, M. Ito, K. Mori, H. Yagasaki, A.H. Kafrawy, Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria, *J. Biomed. Mater. Res.* 46 (1999) 418-423.
134. P.J. VandeVord, H.W.T. Matthew, S.P. DeSilva, L. Mayton, B. Wu, P.H. Wooley, Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice, *J. Biomed. Mater. Res.* 59 (2002) 585-590.
135. X. Wang, J. Ma, Y. Wang, B. He, Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements, *Biomaterials*. 23 (2002) 4167-4176.
136. F.L. Mi, Y.C. Tan, H.F. Liang, H.W. Sung, In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant, *Biomaterials*. 23 (2002) 181-191.
137. A. Dubé, Biocompatibilité et biodégradation d'hydrogels thermosensibles à base de chitosan, Mémoire de maîtrise, Université de Montréal (2003).
138. T.C. Chou, E. Fu, C.J. Wu, J.H. Yeh, Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (2003) 480-483.
139. Y. Okamoto, R. Yano, K. Miyatake, I. Tomohiro, Y. Shigemasa, S. Minami, Effects of chitin and chitosan on blood coagulation, *Carbohydr. Polym.* 53 (2003) 337-342.
140. R. Huang, Y. Du, J. Yang, L. Fan, Influence of functional groups on the in vitro coagulant activity of chitosan sulfate, *Carbohydrate Res.* 338 (2003) 483-489.
141. P. Vongchan, W. Sajomsang, D. Subyen, P. Kongtawelert, Anticoagulant activity of a sulfated chitosan, *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 1239-1242.



142. K.Y. Lee, W.S. Ha, W.H. Park, Blood compatibility and biodegradability of partially *N*-acetylated chitosan derivatives, *Biomaterials*. 16 (1995) 1211-1216.
143. H. Ueno, T. Mori, T. Fujinaga, Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52 (2001) 105-115.
144. T.A. Khan, K.K. Peh, A preliminary investigation of chitosan film as dressing for punch biopsy wounds in rats, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 6 (2003) 20-26.
145. D.K. Kweon, S.B. Song, Y.Y. Park, Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator, *Biomaterials*. 24 (2003) 1595-1601.
146. F.L. Mi, Y.B. Wu, S.S. Shyu, J.Y. Schoung, Y.B. Huang, Y.H. Tsai, J.Y. Hao, Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery, *J. Biomed. Mater. Res.* 59 (2002) 438-449.
147. K. Mizuno, K. Yamamura, K. Yano, T. Osada, S. Saeki, N. Yakimoto, T. Sakurai, Y. Nimura, Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice, *J. Biomed. Mater. Res.* 64A (2003) 177-181.
148. J.S. Park, S.H. Choi, I.S. Moon, K.S. Cho, J.K. Chai, C.K. Kim, Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs, *J. Clin. Periodontol.* 30 (2003) 443-453.
149. H. Li, F. Berthod, W. Xu, O. Damour, L. Germain, F.A. Auger, Use of in vitro reconstructed skin to cover skin flap donor site, *J. Surg. Res.* 73 (1997) 143-148.
150. F. Berthod, L. Germain, H. Li, W. Xu, O. Damour, F.A. Auger, Collagen fibril network and elastic system remodeling in a reconstructed skin transplanted on nude mice, *Matrix Biol.* 20 (2001) 463-473.
151. M. Gingras, I. Paradis, F. Berthod, Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice, *Biomaterials*. 24 (2003) 1653-1661.
152. Q. Hu, B. Li, M. Wang, J. Shen, Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ

- hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture, *Biomaterials*. 25 (2004) 779-785.
153. J.Y. Lee, S.H. Nam, S.Y. Im, Y.J. Park, Y.M. Lee, Y.J. Seol, C.P. Chung, S.J. Lee, Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials, *J. Controlled Release*. 78 (2002) 187-197.
  154. H. Bokura, S. Kobayashi, Chitosan decreases total cholesterol in women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Eur. J. Clin. Nutr.* 57 (2003) 721-725.
  155. D.D. Gallaher, Chitosan, cholesterol lowering, and caloric loss, *Agro Food Ind. Hi Tec.* 14 (2003) 32-35.
  156. K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura, I. Azuma, Immunological activity of chitin and its derivatives, *Vaccine*. 2 (1984) 93-98.
  157. C. Qin, Y. Du, L. Xiao, Z. Li, X. Gao, Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 31 (2003) 111-117.
  158. A. Tokoro, N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, M. Suzuki, Growth-inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.* 36 (1988) 784-790.
  159. R. Seljelid, A water-soluble aminated B1-3D-glucan derivative causes regression of solid tumors in mice, *Biosci. Rep.* 6 (1986) 845-851.
  160. H.S. Kas, Chitosan: properties, preparations and applications to microparticulate systems, *J. Microencapsulation*. 14 (1997) 689-711.
  161. L. Illum, Chitosan and its uses as a pharmaceutical excipient, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1326-1331.
  162. V. Dodane, V.D. Vilivalam, Pharmaceutical applications of chitosan, *PSTT*. 1 (1998) 246-253.
  163. O. Felt, P. Buri, R. Gurny, Chitosan : A unique polysaccharide for drug delivery, *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 24 (1998) 1-15.
  164. A.K. Singla, M. Chawla, Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 1047-1067.
  165. E. Khor, L.Y. Lim, Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*. 24 (2003) 2339-2349.

166. C.M. Lehr, J.A. Bouwstra, E.H. Schacht, H.E. Junginger, In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *Int. J. Pharm.* 78 (1992) 43-48.
167. H. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Niwa, T. Hino, Y. Kawashima, Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes, *Pharm. Res.* 13 (1996) 896-901.
168. O. Felt, P. Furrer, J.M. Mayer, B. Plazonnet, P. Buri, R. Gurny, Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention, *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 185-193.
169. Y. Pan, Y.J. Li, H.Y. Zhao, J.M. Zheng, H. Xu, G. Wei, J.S. Hao, F.D. Cui, Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 139-147.
170. R. Fernandez-Urrusuno, P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1576-1581.
171. M. Thanou, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52 (2001) 117-126.
172. M. Thanou, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50 (2001) S91-S101.
173. J.H. Hamman, M. Stander, A.F. Kotzé, Effect of the degree of quaternization of *N*-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia, *Int. J. Pharm.* 232 (2002) 235-242.
174. P. Sinswat, P. Tengamnuay, Enhancing effect of chitosan on nasal absorption of salmon calcitonin in rats: comparison with hydroxypropyl- and dimethyl-*b*-cyclodextrins, *Int. J. Pharm.* 257 (2003) 15-22.
175. A. Bernkop-Schnurch, Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems, *Int. J. Pharm.* 194 (2000) 1-13.
176. H. Tozaki, T. Odoriba, N. Okada, T. Fujita, A. Terabe, T. Suzuki, S. Okabe, S. Muranishi, A. Yamamoto, Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large

- intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats, *J. Controlled Release*. 82 (2002) 51-61.
177. L. Illum, S.S. Davis, M. Pawula, A.N. Fisher, D.A. Barrett, N.F. Farraj, P.N. Shaw, Nasal administration of morphine-6-glucoronide in sheep - A pharmacokinetic study, *Biopharm. Drug. Disp.* 17 (1996) 717-724.
  178. A.M. Dyer, M. Hinchcliffe, P. Watts, J. Castile, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, A. Smith, L. Illum, Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 19 (2002) 998-1008.
  179. L. Illum, P. Watts, A.N. Fisher, M. Hinchcliffe, H. Norbury, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, S.S. Davis, Intranasal delivery of morphine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301 (2002) 391-400.
  180. H. Pavis, A. Wilcock, J. Edgecombe, D. Carr, C. Manderson, A. Church, A. Fisher, Pilot study of nasal morphine-chitosan for the relief of breakthrough pain in patients with cancer, *J. Pain Symptom Manag.* 24 (2002) 598-602.
  181. L. Illum, Nasal drug delivery - possibilities, problems and solutions, *J. Controlled Release*. 87 (2003) 187-198.
  182. I. van der Lubben, G. Kersten, M.M. Fretz, C. Beuvery, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice, *Vaccine*. 21 (2003) 1400-1408.
  183. K.H.G. Mills, C. Cosgrove, E.A. McNeela, A. Sexton, R. Giemza, I. Jabbal-Gill, A. Church, W. Lin, L. Illum, A. Podda, R. Rappuoli, M. Pizza, G.E. Griffin, D.J.M. Lewis, Protective levels of diphtheria-neutralizing antibody induced in healthy volunteers by unilateral priming-boosting intranasal immunization associated with restricted ipsilateral mucosal secretory immunoglobulin A, *Infect. Immun.* 71 (2003) 726-732.
  184. W.R. Chen, R.L. Adams, R. Carubelli, R.E. Nordquist, Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment, *Cancer Lett.* 115 (1997) 25-30.
  185. M. Koping-Hoggard, I. Tubulekas, H. Guan, K. Edwards, M. Nilsson, K.M. Varum, P. Artursson, Chitosan as a nonviral gene delivery system.

Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo, *Gene Ther.* 8 (2001) 1108-1121.

186. M. Kumar, A.K. Behera, R.F. Lockey, J. Zhang, G. Bhullar, C. Perez de la Cruz, L.C. Chen, K.W. Leong, S.K. Huang, S.S. Mohapatra, Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection, *Human Gene Ther.* 13 (2002) 1415-1425.
187. M. Iqbal, W. Lin, I. Jabbal-Gill, S.S. Davis, M.W. Steward, L. Illum, Nasal delivery of chitosan-DNA plasmid expressing epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) induces protective CTL responses in BALB/c mice, *Vaccine.* 21 (2003) 1478-1485.
188. A. Merkli, J. Heller, C. Tabatabay, R. Gurny, Semi-solid hydrophobic bioerodible poly(ortho ester) for potential application in glaucoma filtering surgery, *J. Controlled Release.* 29 (1994) 105-112.

## **CHAPITRE 2**

### **IN SITU-FORMING HYDROGELS – REVIEW OF TEMPERATURE-SENSITIVE SYSTEMS**

Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

\_\_\_\_\_

Accepted for publication in European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.

## 2.1 Abstract

In the past few years, an increasing number of *in situ*-forming systems have been reported in the literature for various biomedical applications, including drug delivery, cell encapsulation, and tissue repair. There are several possible mechanisms that lead to *in situ* gel formation: solvent exchange, UV-irradiation, ionic cross-linkage, pH change, and temperature modulation. The thermosensitive approach can be advantageous for particular applications as it does not require organic solvents, co-polymerization agents, or an externally-applied trigger for gelation. In the last 2 decades, several thermosensitive formulations have been proposed. This manuscript focuses on aqueous polymeric solutions that form implants *in situ* in response to temperature change, generally from ambient to body temperature. It mainly reviews the characterization and use of polysaccharides, *N*-isopropylacrylamide copolymers, poly(ethylene oxide-*b*-propylene oxide-*b*-ethylene oxide) (poloxamer) and its copolymers,

poly(ethylene oxide)/(D,L-lactic acid-*co*-glycolic acid) copolymers, and thermosensitive liposome-based systems.

**Keywords:** thermosensitivity, implants, in situ, injectables, drug delivery

## 2.2 Table of contents

### 2.3 Introduction

### 2.4 Polysaccharides

#### 2.4.1 Cellulose derivatives

#### 2.4.2 Xyloglucan

#### 2.4.3 Chitosan and glycerophosphate

### 2.5 *N*-isopropylacrylamide copolymers

#### 2.5.1 Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylic acid)

#### 2.5.2 Poly(*N*-isopropylacrylamide) / poly(ethylene oxide)

### 2.6 Poloxamer systems

#### 2.6.1 Poloxamer (Pluronic<sup>®</sup>)

#### 2.6.2 Poloxamer / poly(acrylic acid)

### 2.7 Poly(ethylene oxide) / poly(D,L-lactic acid-*co*-glycolic acid)

### 2.8 Thermosensitive liposomes as a physical barrier between reactive species

### 2.9 Miscellaneous

#### 2.9.1 Poly(organophosphazene) derivatives

#### 2.9.2 Poly(1,2-propylene phosphate)

### 2.10 Conclusion



## 2.3 Introduction

In the past few years, an increasing number of *in situ* forming systems have been reported in the literature for various biomedical applications, including drug delivery, cell encapsulation, and tissue repair. These systems are injectable fluids that can be introduced into the body in a minimally-invasive manner prior to solidifying or gelling within the desired tissue, organ, or body cavity. Injectable gel-forming matrices offer several advantages over systems shaped into their final form before implantation. For example, injectable materials do not require a surgical procedure for placement (and withdrawal if not biodegradable), and various therapeutic agents can be incorporated by simple mixing. When they are used to fill a cavity or a defect, their flowing nature enables a good fit. *In situ* implant formation can occur as a result of either a physical or chemical change of the system.

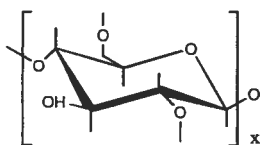
There are several possible mechanisms leading to *in situ* implant formation. The solvent exchange approach consists of dissolving a water-insoluble polymer in a water-miscible, biocompatible solvent. Upon contact with body fluids, the solvent diffuses out of the polymer while water permeates the liquid polymer matrix. Due to its insolubility in water, the polymer precipitates, resulting in the formation of a solid polymeric implant (1-5). However, incomplete implant formation can be observed *in vivo* resulting in a high initial release and local or systemic toxicity. Also, the organic solvent used to solubilize the polymer can physically denature labile compounds such as proteins. Photopolymerization has also been proposed to prepare *in situ* implants. This approach has been taken to produce depot formulations (6), biological adhesives for soft tissues (7-10), and orthopaedic biomaterials (11). However, photopolymerization requires the presence of a photoinitiator at the gelation site which can be toxic. Furthermore, the penetration capacity of the radiation source limits the number of application sites, and the reaction can evoke enough heat to damage surrounding tissues.

*In situ*-forming systems that do not require organic solvents or copolymerization agents have gained increasing attention. These are liquid aqueous solutions before administration, but gel under physiological conditions. Gelation can occur *in situ* by ionic cross-linking (12, 13) or after a change in pH (14, 15) or temperature. The latter approach exploits temperature-induced phase transition.

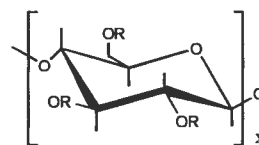
Some polymers undergo abrupt changes in solubility in response to increases in environmental temperature (lower critical solution temperature, LCST). This phase separation is generally viewed as a phenomenon governed by the balance of hydrophilic and hydrophobic moieties on the polymer chain and the free energy of mixing (16-18). The free energy of association varies with enthalpy, entropy and temperature ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). As the positive enthalpy term ( $\Delta H$ ) is smaller than the entropy term ( $\Delta S$ ), an increase in temperature results in a larger  $T\Delta S$ , making  $\Delta G$  negative and favoring polymer chain association. The temperature dependence of certain molecular interactions, such as hydrogen bonds and hydrophobic effects, contribute to phase separation. At the LCST, hydrogen bonding between the polymer and water becomes unfavorable, compared to polymer-polymer and water-water interactions, and an abrupt transition occurs as the solvated macromolecule quickly dehydrates and changes to a more hydrophobic structure (18, 19). Alternatively, some amphiphilic polymers, that self-assemble in solution, show micelle packing and gel formation because of polymer-polymer interactions when temperature is increased (20).

The ideal system would be a solution that is a free-flowing, injectable liquid at ambient temperature. It should then gel at body temperature with minimal syneresis. Moreover, loading with drugs or cells should be achieved by simple mixing. When administered parenterally, these systems should exhibit a pH close to neutrality and should be bioresorbable. This paper focuses on polymeric solutions that can form implants *in situ* in response to temperature

change, from ambient to body temperature. It mainly reviews the characterization and use of polysaccharides, *N*-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers, poly(ethylene oxide-*b*-propylene oxide-*b*-ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) and its copolymers, poly(ethylene oxide)/(D,L-lactic acid-*co*-glycolic acid) (PEO/PLGA) copolymers, and thermosensitive liposome-based systems (Fig. 2.1).

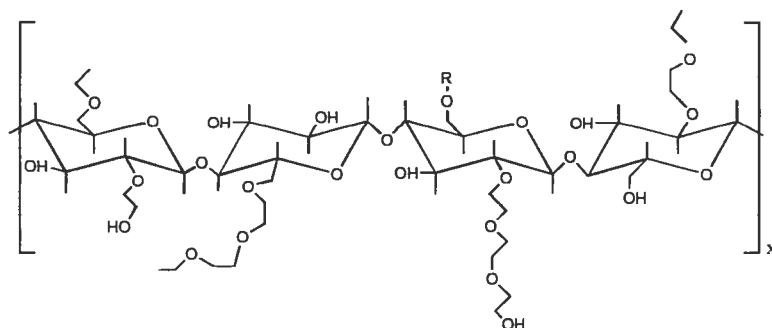


**A - Methylcellulose (MC)**

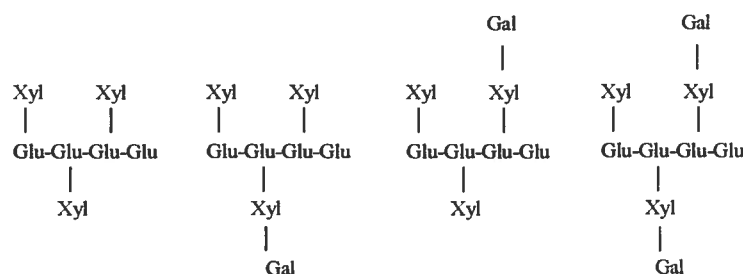


**B - Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)**

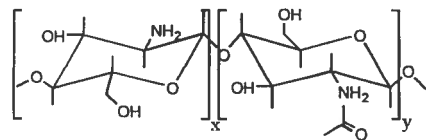
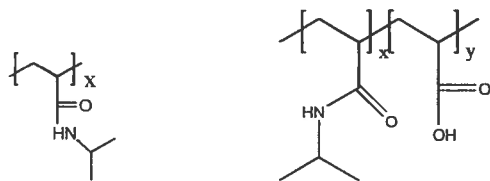
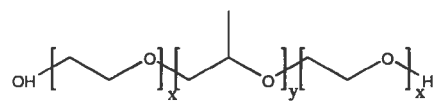
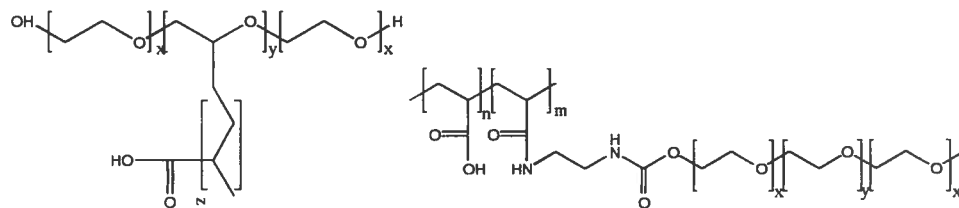
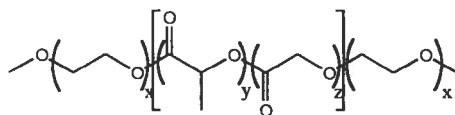
R = CH<sub>3</sub> or CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)OH or H

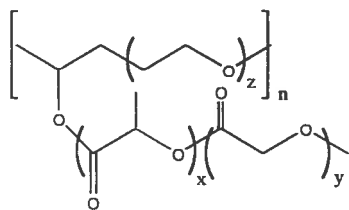


**C - Ethylhydroxyethylcellulose (EHEC)**

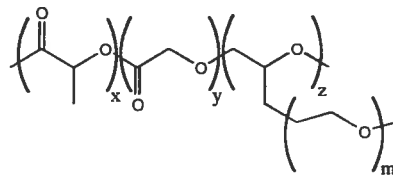


**D - Units structure of xyloglucan: heptasaccharide, octosaccharides and nonasaccharide**

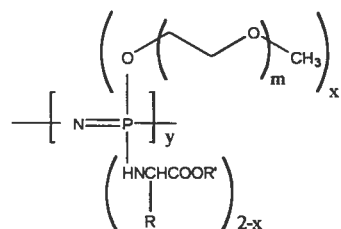
**E - Chitosan****F - PNIPAM****G - P(NIPAM-co-AA)****H - PEO-PPO-PEO (poloxamer)****I - Poloxamer-g-PAA****J - PAA-g-poloxamer****K - PEO-PLGA-PEO**



L - PEO-g-PLGA



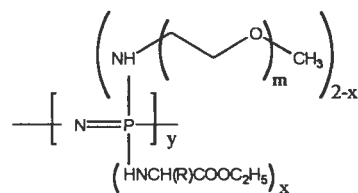
M - PLGA-g-PEO



R = H (Gly), CH<sub>3</sub> (Ala), COOR' (Mal), CH<sub>2</sub>COOR' (Asp), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOR' (Glu)

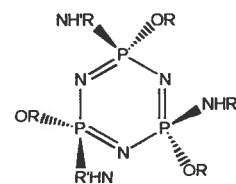
R' = CH<sub>3</sub> (Me), C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (Et), CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Bz)

N - Poly(organophosphazene) derivatives



R = CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

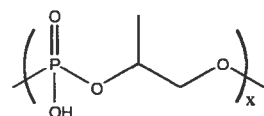
O - Poly(organophosphazene) derivatives



OR = alkoxy PEG

NHR' = amino acid esters

P - Cyclotriphosphazenes



Q - Poly(1,2-propylene phosphate)

Figure 2.1 Chemical formulas of hydrogel-forming polymers

## 2.4 Polysaccharides

### 2.4.1 Cellulose derivatives

Thermoreversible gels can be prepared with naturally-occurring polymers. Most natural polymer aqueous solutions form a gel phase when their temperature is lowered. Classic examples of natural polymers exhibiting a sol-gel transition include gelatin and carrageenan. At elevated temperatures, these polymers adopt a random coil conformation in solution. Upon cooling, a continuous network is formed by partial helix formation (21, 22). Some cellulose derivatives are an exception to this gelation mechanism. At low concentrations (1-10 wt%), their aqueous solutions are liquid at low temperature, but gel upon heating. Methylcellulose (Fig. 2.1A) (23, 24) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) (Fig. 2.1B) (24) are typical examples of such polymers. Methylcellulose solutions transform into opaque gels between 40 and 50°C (23, 24), whereas HPMC shows phase transition between 75 and 90°C (24). These phase transition temperatures can be lowered by chemical or physical modifications. For example, NaCl decreases the transition temperature of methylcellulose solutions to 32-34°C (23, 24). Similarly, by reducing the hydroxypropyl molar substitution of HPMC, its transition temperature can be lowered to ~40°C (24).

Gelation of methylcellulose or HPMC solutions is primarily caused by the hydrophobic interaction between molecules containing methoxy substitution. At low temperatures, the macromolecules are hydrated, and there is little polymer-polymer interaction other than simple entanglement. As the temperature is raised, the polymers gradually lose their water of hydration, which is reflected by a decline in relative viscosity. Eventually, when sufficient but not complete dehydration of the polymer occurs, polymer-polymer associations take place, and the system approaches an infinite network structure, as reflected experimentally by a sharp rise in relative viscosity (23).

This sol-gel transformation has been exploited to design *in situ*-gelling systems. Tate *et al.* (25) evaluated methylcellulose-based constructs as potential tissue engineering scaffolds for the repair of brain defects. These systems exhibited low viscosity at 23°C and formed soft gels intracerebrally at 37°C. The gels were biocompatible both in the presence of cultured cells and in the injured rat brain.

Aqueous solutions of ethyl(hydroxyethyl)cellulose (EHEC) (Fig. 2.1C) also exhibit thermosensitive behavior. However, their viscosity decreases with temperature, which is not appropriate for the preparation of *in situ*-forming implants. At the end of the 1980's, Carlsson *et al.* (26, 27) reported that the addition of an ionic surfactant, like sodium dodecyl sulphate or cetyl triammonium bromide, to semi-dilute (1-4 wt%) EHEC solutions completely changed their thermal behavior. These systems underwent sol-gel phase transition upon heating from room temperature to 30-40°C, resulting in the formation of stiff and clear gels. The rheological properties of such gels were further investigated by Nyström *et al.* (28). The surfactant was found to interact with EHEC by a strongly cooperative process implying the formation of micelle-like surfactant clusters on the polymer (27, 29, 30). Binding increased with rising temperature, and gelation was attributed to the ability of micelle-like clusters on the polymer chain to couple with segments on other chains (27, 29).

Scherlund *et al.* (31) evaluated the EHEC/surfactant system for the local delivery of anesthetic agents to the periodontal pocket. They incorporated small amounts of lidocaine and prilocaine into the solution without affecting gelation behavior. The tested formulations showed sustained drug release over a minimum of 60 min, making them interesting for short-term pain control. From a toxicological point of view, the need for inclusion of an ionic surfactant in such a formulation may, however, impair its clinical development.

### 2.4.2 Xyloglucan

Xyloglucan (Fig. 2.1D), a polysaccharide derived from tamarind seed, forms thermoresponsive gels in water, under certain conditions. Xyloglucan is composed of a (1-4)- $\beta$ -D-glucan backbone chain (GLU) which presents (1-6)- $\alpha$ -D-xylose branches (XYL) partially substituted by (1-2)- $\beta$ -D-galactoxylose (GAL). Tamarind seed xyloglucan is composed of three units of xyloglucan oligomers with heptasaccharide, octosaccharide and nonasaccharide which differ in the number of galactose side chains. When xyloglucan is partially degraded by  $\beta$ -galactosidase, the resultant product exhibits thermally-reversible gelation in dilute aqueous solutions. Such behavior does not occur with native xyloglucan. Gelation is only possible when the galactose removal ratio exceeds ~35% (32). The transition temperature is inversely related to polymer concentration (33) and the galactose removal ratio (32). For example, the sol-gel transition of xyloglucan was shown to decrease from 40 to 5°C when the galactose removal ratio increased from 35 to 58%.

Xyloglucan gels have been evaluated for the rectal delivery of indomethacin in rabbits (33). They provided a broader absorption peak and longer residence time than commercial suppositories. Moreover, morphological studies of rectal mucosa after a single administration showed no evidence of tissue damage. Intraperitoneal administration of mitomycin C in a 1.5-wt% xyloglucan gel to rats resulted in a broad concentration-time profile, as opposed to a narrow peak and rapid disappearance from the peritoneal fluid and plasma when the drug was given as a solution (34). In 2 other studies, the gels were investigated as vehicles for the oral delivery of indomethacin (35) and theophylline (36). The bioavailability of indomethacin from xyloglucan gels was increased approximately 3-fold compared to the control suspension. Likewise, theophylline bioavailability was 1.7-2.5 times higher than that of the commercially-available oral, sustained-release liquid dosage form. Xyloglucan formulations were also assessed for ocular delivery of pilocarpine, using



poloxamer 407 as a positive thermosensitive control (37). The 1.5-wt% xyloglucan formulation enhanced the mitotic response to a degree similar to that of a 25-wt% poloxamer 407 gel. More recently, xyloglucan gels were evaluated for the percutaneous administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs (38). After topical application, the xyloglucan formulations performed better than poloxamer 407 gels in improving the bioavailabilities of ibuprofen and ketoprofen. As for cellulose derivatives, xyloglucan solutions gel at low concentrations (1-2 wt%), and this may be advantageous from a toxicological viewpoint as the amount of administered polymer is low. In addition, xyloglucan is approved for use as a food additive. However, its relatively low transition temperature (22-27°C) makes handling at room temperature problematic.

### 2.4.3 Chitosan and glycerophosphate

Chenite *et al.* (39, 40) developed a novel approach to produce thermally-sensitive neutral solutions based on chitosan/polyol salt combinations. Chitosan (Fig. 2.1E) is the deacetylated derivative of chitin, a natural component of shrimp and crab shells. It is a biocompatible, pH-dependent cationic polymer, which is soluble in water up to pH 6.2. Basification of chitosan aqueous solutions above this pH leads to the formation of an hydrated gel-like precipitate. Phase separation ensues from the neutralization of chitosan amine groups and the consequent elimination of repulsive interchain electrostatic forces, which subsequently allow for extensive hydrogen bonding and hydrophobic interactions between chains. pH-gelling, cationic chitosan solutions have been transformed into thermally-sensitive, pH-dependent, gel-forming systems by the addition of polyol salts (*e.g.*  $\beta$ -glycerophosphate, GP). These formulations possess a neutral pH, remain liquid at or below room temperature, and form monolithic gels at body temperature. The stability of the sol at room temperature and the gelation time increase as the chitosan degree of deacetylation decreases (41). Like other polysaccharide systems, the gels are obtained at low polymer concentrations (~2 wt%).

Solubility at low temperatures is probably due to hydration of the chitosan promoted by GP. Upon heating, the chitosan chains lose their water of hydration, bonding between chains can occur and gelation proceeds. Three types of interactions may be involved in the gelation process: 1) electrostatic attraction between the ammonium groups of chitosan and the phosphate group of GP; 2) hydrogen bonding between polymer chains as a consequence of reduced electrostatic repulsion after neutralization of the chitosan solution with GP; and 3) chitosan-chitosan hydrophobic interactions. Readers are referred to the original papers for more details on the gelation mechanism of chitosan/GP solutions (40, 41).

In parallel, our group evaluated the chitosan/GP system for pharmaceutical applications (41-43). Stability studies showed that solutions made with 84% deacetylated chitosan could be stored for 3 months at 4°C without apparent change in viscosity. *In vitro* release experiments revealed that the system could deliver macromolecules ( $M_w$  12,000-148,000) over a period of several hours to a few days (41). However, due to high gel porosity, low molecular weight hydrophilic compounds (<1,000 g/mol) were completely released within hours. To achieve sustained delivery that would be independent of the drug's molecular weight, hydrophilic compounds were first loaded into liposomes, which were then mixed with the thermosensitive solution (42). This approach substantially slowed the release rate (Fig. 2.2), and the release profile of the incorporated compound could be controlled by adjusting liposome characteristics, such as size and composition. Recently, we proposed to use the thermosensitive hydrogel for the local administration of paclitaxel, a hydrophobic anticancer drug, at tumor resection sites to prevent local tumor recurrence (43). *In vitro* release profiles demonstrated controlled drug delivery for over 1 month. In mice, intratumoral injection of the paclitaxel-loaded hydrogel was as efficacious as 4 intravenous injections of the commercially-available Taxol<sup>®</sup> formulation in inhibiting the growth of EMT-6 cancer cells, and proved to be less toxic (Fig. 2.3).

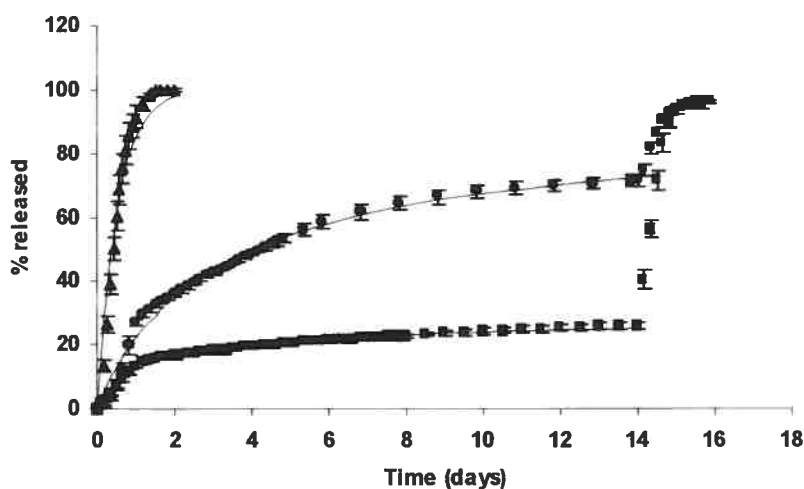


Figure 2.2 *In vitro* cumulative release of carboxyfluorescein, free (triangles) or encapsulated in 100- (circles) or 280-nm (squares) egg phosphatidylcholine/cholesterol liposomes, from the chitosan/GP gel in PBS at 37°C. Each point represents the mean value  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). The solid lines represent the simulated release kinetics. Reprinted with permission from ref. (42).

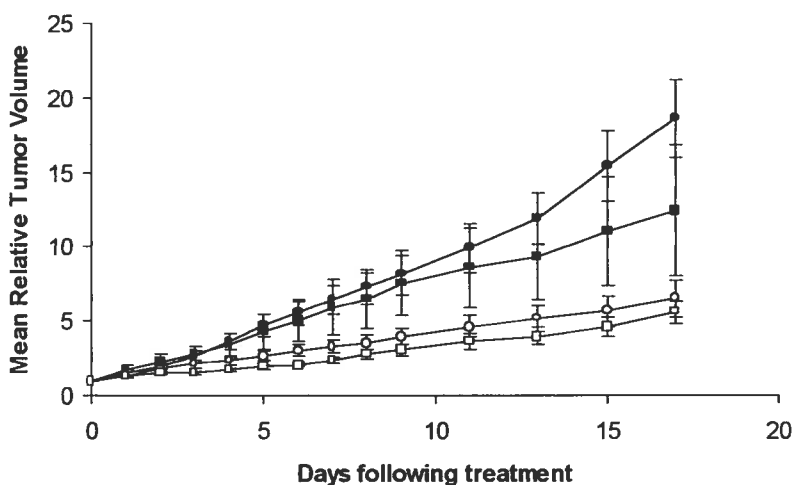


Figure 2.3 *In vivo* antitumor effect in Balb/c mice bearing an EMT-6 tumor. Saline 0.2 mL/day intravenous  $\times$  4 days (closed circles,  $n=8$ ), Taxol<sup>®</sup> 10 mg/kg/day intravenous  $\times$  4 days (open circles,  $n=8$ ), chitosan/GP solution 10  $\mu$ L intratumoral (closed squares,  $n=8$ ) and paclitaxel/chitosan/GP solution (64 mg/mL paclitaxel) 10  $\mu$ L (40 mg/kg paclitaxel) intratumoral (open squares,  $n=8$ ). Reprinted with permission from ref. (43).

The chitosan/GP system was also evaluated as a tool for cartilage repair. Hoemann *et al.* (44) reported that primary calf chondrocytes could proliferate in solidified chitosan/GP solutions both *in vitro* and *in vivo*. Mechanical testing of 3-week aged *in vitro* implants demonstrated the initiation of functional matrix deposition. After injection into bone defects in rabbits, the chitosan/GP solution adhered to both bone and cartilage. Later, a hybrid implant, made of the chitosan/GP solution and whole blood, was developed to improve cartilage healing (45). This new system, named CarGel<sup>®</sup>, was investigated in rabbits, sheep, and horses. The *in vitro* mixture of chitosan/GP with whole blood resulted in the accelerated formation of a more adhesive and voluminous clot scaffolding. In healing articular defects, specific repair responses were observed, including enhanced chemotaxis of bone marrow stromal cells, and temporarily increased vascularity of the repair tissue. No local or systemic toxic effects were seen in CarGel<sup>®</sup>-treated animals. Recently, human studies were undertaken with this new product.

Preliminary biocompatibility experiments showed that the local injection of chitosan/GP solutions in the rat hind paw led to an acute inflammatory response, which was inversely related to the chitosan's degree of deacetylation (46). This response was substantially more important than that observed after the transdermal injection of similar solutions in the rat dorsal region (47), suggesting that the extent of the inflammatory response depended on the injection site. Hind paw injections may have elicited a more pronounced reaction because of differences in blood flow, tight geometry of the injection space, etc.

Jarry *et al.* (47, 48) evaluated the effects of sterilization on chitosan/GP solutions. Initially, steam sterilization experiments were conducted on chitosan in the dry state. However, it was noted that, upon dissolution in water and the addition of GP, viscosity of the solutions increased dramatically compared to nonsterilized samples, compromising injectability of the system. Accordingly, it was decided to sterilize the polymer in solution. Steam sterilization of chitosan

solutions induced molecular weight reduction, which led to a decrease in dynamic viscosity, gelling rate, and mechanical strength of the chitosan/GP hydrogels. Thus, this sterilization process may be considered when high mechanical performance is not critical or essential for implant function, such as in the case of controlled drug delivery.

In conclusion, chitosan/GP hydrogels constitute promising implants for pharmaceutical and bioengineering applications. Because of their high porosity, they are more adapted to the delivery of macromolecules and poorly water-soluble drugs.

## 2.5 *N*-isopropylacrylamide copolymers

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) (Fig. 2.1F) is a non-biodegradable polymer with a LCST  $\sim 32^{\circ}\text{C}$  in water (17), and cross-linked gels of this material collapse around this temperature (49, 50). The PNIPAM LCST can be controlled by copolymerization with other monomers. The addition of hydrophilic monomers typically increases the LCST whereas the incorporation of more hydrophobic units has the opposite effect (51).

### 2.5.1 Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylic acid)

In the 1990's, Han and Bae (52) reported that an aqueous solution of high molecular weight P(NIPAM-*co*-AA) (Fig. 2.1G), synthesized in benzene (with 2 mol% AA in feed), showed reversible gelation at  $\sim 32^{\circ}\text{C}$ , above a critical concentration. Aqueous solutions of this copolymer did not just precipitate or result in a shrunken mass when the temperature was elevated above its LCST, like aqueous solutions of PNIPAM. A typical gelation process with a 5-wt%

solution in phosphate-buffered saline (pH 7.4) is illustrated in Figure 2.4A and B. The clear polymer solution (phase A) became cloudy as temperature increased to 27°C (cloud temperature). At this temperature, the solution was still freely mobile (phase B). With further heating up to the gelation temperature (35°C), the polymer solution became immobile (phase C). The initially-formed gel was translucent, and turned opaque with increasing temperature. At 43°C (gel-shrinking temperature), the gel started to shrink and expel water (syneresis). Upon cooling, it reverted to the sol state with no hysteresis between sol-gel and gel-sol temperatures (Fig. 2.4B). An interesting feature was that the gel did not dissolve or change its hydration state upon the addition of water (no swelling). The authors speculated that as temperature increases, polymer chains with lower AA content precipitate first, while those with higher AA content remain as partially collapsed globules or in a fully-expanded coil state. The completely collapsed globules, entangled with the expanded coils, are thought to produce hydrophobic aggregates that form physical junctions.

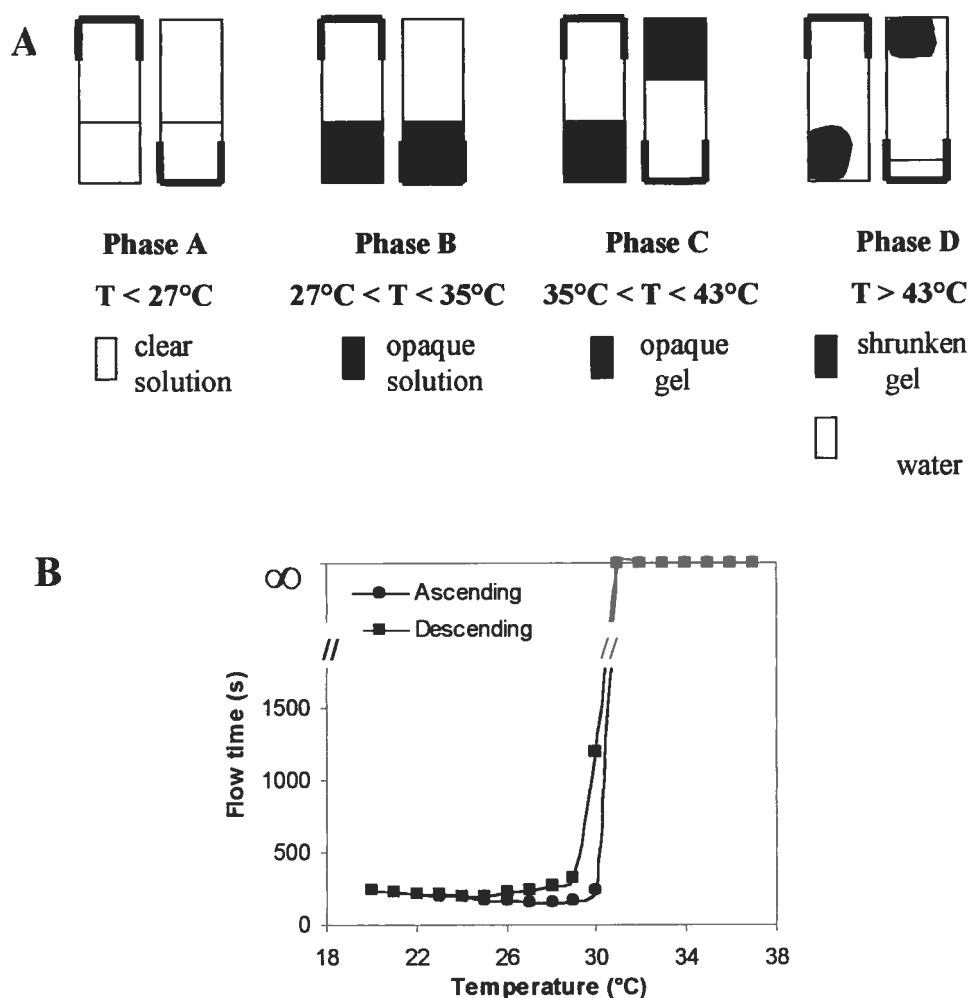


Figure 2.4 Phase transitions (A) and viscosity (flow time through a Cannon-Fenske viscometer) of an aqueous solution of P(NIPAM-*co*-AA) as a function of temperature. Adapted with permission from ref. (52).

P(NIPAM-*co*-AA) solutions were investigated as cell matrices in refillable bioartificial pancreas (53-58). The idea originated from the observation that islets of Langerhans tend to malfunction at some point after transplantation and have to be replaced. Also, aggregation of the islets can lead to necrosis. The thermosensitive solutions were proposed as an extracellular matrix for islets placed in an immunoprotecting pouch installed in diabetic patients (Fig. 2.5). An islet/polymer solution can be injected into the pouch where the polymer forms a gel, immobilizing the islets. To replace the islets, the polymer matrix is cooled

below the critical temperature, causing the gel to redissolve. The solution is then withdrawn, and a fresh islet/polymer suspension is injected. It was shown that the copolymer efficiently immobilized rat islets without impairing insulin secretion (53-55). Compared to free islets, entrapment in the gel resulted in prolonged insulin secretion (55). Moreover, P(NIPAM-*co*-AA)-entrapped rat islets responded faster and with greater magnitudes to changes in glucose concentration than islets in an alginate gel. The addition of glucagon-like peptide-1, a potent islet stimulant, was also investigated (56). Its presence in the preparation significantly enhanced insulin secretion without affecting islet viability. Similarly, a hemoglobin-PEO conjugate was used, as it is believed that the low functionality and viability of immunoprotected islets are closely associated with low oxygen tension (57). Insulin secretion functions, as well as islet viability, were significantly enhanced by the addition of hemoglobin. The same approach was later taken to develop a biohybrid artificial liver (59). Hepatocytes cultured as spheroids in the thermoreversible matrix exhibited greater viability and enhanced liver-specific functions vs control cells. These studies demonstrated the potential of the system as a temporary cell-supporting matrix, but the non-biodegradability of the polymer may limit its biomedical applications.

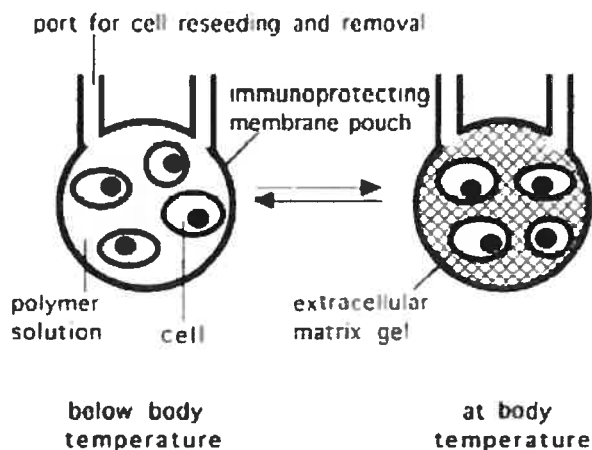


Figure 2.5 Schematic diagram illustrating the concept for a refillable cell delivery system with a thermally reversible extracellular matrix. Reprinted with permission from ref. (54).



### 2.5.2 Poly(*N*-isopropylacrylamide) / poly(ethylene oxide)

A new family of polymers that self-assemble to form gels in a thermoreversible fashion has been proposed recently by Lin and Cheng (60). It consists of block linear and star copolymers with a central hydrophilic PEO segment (A) and temperature-responsive PNIPAM terminal segments (B). Linear and star copolymers of PEO and PNIPAM form liquid aqueous solutions at room temperature that transform to relatively strong elastic gels upon heating. Multiple-arm copolymers yield gels *via* physical cross-links between aggregates of PNIPAM segments, whereas diblock copolymers gel by a micellar aggregation mechanism (see Section 4). The rheological properties of the hydrogels were found to depend on molecular architecture, with the star structure having 4 PNIPAM terminal segments showing superior qualities. These copolymer solutions presented low to moderate injection viscosities, high gel strengths, low degrees of syneresis, and rapid gelation kinetics. So far, the systems have not been investigated for biomedical purposes.

## 2.6 Poloxamer systems

### 2.6.1 Poloxamer (Pluronic®)

The poloxamers (Fig. 2.1H) consist of more than 30 different nonionic surface-active agents. These polymers are ABA-type triblock copolymers composed of PEO (A) and PPO units (B). The poloxamer series covers a range of liquids, pastes, and solids, with molecular weights and ethylene oxide-propylene oxide weight ratios varying from 1,100 to 14,000 and 1:9 to 8:2, respectively. Concentrated aqueous solutions of poloxamer form thermoreversible gels.

The gelation mechanism of poloxamer solutions has been investigated extensively, but is still being debated. Ultrasonic velocity, light-scattering and small-angle neutron scattering measurements of aqueous poloxamer solutions have clearly indicated a micellar mode of association (61-66). Micelle formation occurs at the critical micellization temperature as a result of PPO block dehydration (63, 67). With increasing temperature, micellization becomes more important, and at a definite point, micelles come into contact and no longer move. In addition, the formation of highly-ordered structures, such as cubic crystalline phase, has been proposed as the driving force for gel formation (20, 64-66), but this hypothesis has been questioned recently. Thus, packing of micelles and micelle entanglements may be possible mechanisms of poloxamer solution gelation with increased of temperature (68).

Poloxamer 407 (Pluronic® F127) was found to gel at a concentration of 20 wt% at 25°C, which is less than that of the other members of the poloxamer series. At room temperature (<25°C), the solution behaves as a mobile viscous liquid, which is transformed into a semisolid transparent gel at body temperature (37°C). Preliminary toxicity data indicate that this copolymer is well tolerated

(69). Taken together, these results have prompted the use of poloxamer 407 in the design of medical, pharmaceutical, and cosmetic systems. Early studies evaluated poloxamer 407 thermosensitive solutions for the treatment of burns (69), topical administration of anticancer agents (70), and sustained delivery of drugs after extravascular parenteral injection (71). Over the past 15 years, this copolymer has been investigated extensively for various applications, and it is not the intent of this paper to review them all. Some recent applications are reported in Table 2.1 and discussed below. After parenteral injection, poloxamer gels can prolong drug release compared to solutions, but the delivery period rarely exceeds a few days (72-76). This characteristic makes poloxamer gels interesting for short-term therapies like pain management (74), infection treatment (73, 76), and fertility control (75). Besides injectables, other administration routes have been evaluated, such as rectal (77, 78), vaginal (79, 80), transdermal (81, 82) and ophthalmic (83, 84). Poloxamer formulations generally increased drug residence time at application sites, resulting in improved bioavailability and efficacy (Fig. 2.6).

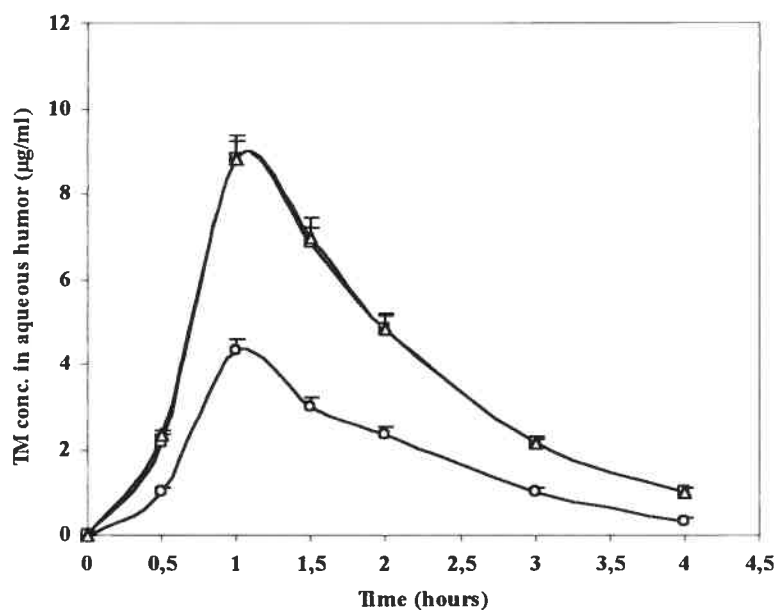


Figure 2.6 Timolol concentration in aqueous humor after instillation of timolol aqueous solution (circles), timolol-poloxamer solution (squares) and timolol-poloxamer-methylcellulose solution (triangles). Reprinted with permission from ref. (83).

Tableau 2.1 Poloxamer temperature-sensitive solutions for drug delivery applications: some examples since 1997

Poloxamer	Concentration (wt%)	Drug	Objective of the study	Ref
407	36	Recombinant human growth hormone	Controlled release of human growth hormone following intramuscular or subcutaneous administration.	(72)
407	20 or 30	Insulin	Subcutaneous delivery of peptides and proteins having short half-lives.	(132)
407	25	Vancomycin	Prolonged residence time of vancomycin in a body site with a high infection risk.	(73)
407	25	Ibuprofen	Controlled release of ibuprofen for epidural analgesia.	(74)
407	20	Paclitaxel	Intratatumoral administration of paclitaxel.	(133)
407	25	Deslorelin or GnRH	Intramuscular sustained release of deslorelin and GnRH to induce the release of luteinizing hormone and formation of luteal tissue in cattle.	(75)
407	25, 30 and 35	Ceftiofur	Sustained release gel formulation of ceftiofur for treating foot infections in cattle.	(76)
407 and/or 188 and additives	15 15 and 20	Acetaminophen	Increased bioavailability using an <i>in situ</i> gelling and mucoadhesive liquid suppository.	(77)
407 and 188 and additives	15	Propranolol	Increased bioavailability using an <i>in situ</i> gelling and mucoadhesive liquid suppository.	(78)
407 188	15 15 and 20	Clotrimazole	Prolonged antifungal effects using an <i>in situ</i> gelling and mucoadhesive vaginal gel.	(79, 80)
407 and thickening agents	15, 20 or 25	Timolol maleate	Enhanced ocular bioavailability of timolol maleate.	(83)
407 188	21	None	Development of a thermosetting gel with a suitable phase transition temperature for ocular delivery.	(84)
407		Piroxicam	Enhanced efficacy of piroxicam following percutaneous absorption.	(81)
	46	Fentanyl	Poloxamer gels as release vehicles for percutaneous administration of fentanyl.	(82)

Poloxamer 407 is usually regarded as non-toxic. After intramuscular injection in rabbits, poloxamers 238 and 407 displayed musculoirritancy/toxicity comparable to that of traditional intramuscular vehicles, such as saline and peanut oil (85). However, other studies have reported systemic side effects. Wout *et al.* (86) demonstrated that poloxamer 407 injected intraperitoneally into rats (1.5 g/kg) resulted in sustained hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia (>96 h). Palmer *et al.* (87) obtained similar results in mice. It was suggested that the predominant mechanism for this effect was inhibition of heparin-releasable lipoprotein lipase (88). Blonder *et al.* (89) examined whether lower but clinically useful doses of poloxamer 407 gels induced hyperlipidemia in rabbits. The highest dose (137.5 mg/kg) significantly increased serum triglycerides and cholesterol in both male and female rabbits, with peak values observed 2 days after injection. The lower doses (5.5-27.5 mg/kg) did not alter serum lipids. Hence, the amount of administered polymer should be kept to a minimum, especially when repeated dosing is required.

Potential drawbacks of poloxamer gels include their weak mechanical strength, rapid erosion (*i.e.* dissolution from the surface), and the non-biodegradability of PEO-PPO-PEO, which prevents the use of high molecular weight polymers that cannot be eliminated by renal excretion. To circumvent the biodegradability issue, new polymers were synthesized by linking together a few (usually 3) poloxamer 407 "monomers" *via* degradable carbonate linkage (90). As the carbonate linkages were hydrolyzed under physiological conditions, the hydrogel degraded into soluble poloxamer 407 units and carbonate. Variation of the polymer concentration enabled modification of the gel's dissolution time (25-80 days). Another interesting feature is that oligomerization decreased the critical gel concentration by 2-fold. To address their poor mechanical properties, Cohn *et al.* (91) proposed 2 different strategies: (i) to polymerize poloxamers using hexamethylene diisocyanate as a linker; and (ii) to use phosgene to covalently bind PEO and PPO chains. These new materials achieved viscosities that were at least 15 times higher than poloxamer 407 at 37°C. Moreover, the critical gel

concentration was lowered to 5 wt%. Also, a 30% poly(poloxamer 407)<sub>4</sub> gel delivered drug over a 40-day period vs 7 days for poloxamer 407.

### 2.6.2 Poloxamer / poly(acrylic acid)

High molecular weight poly(acrylic acid) (PAA) is a bioadhesive polymer known to adhere to the hydrated mucosal cells coating the eye, nose, lungs, gastrointestinal tract, and vagina. It is often incorporated into drug delivery systems that come in contact with mucosal surfaces in order to prolong the residence time. As described earlier, random copolymers of NIPAM and AA can gel with an increase in temperature (Section 2.5.1). However, thermosensitivity is lost at physiological pH when the AA content is increased so as to obtain bioadhesive properties. To circumvent this problem, graft copolymers were developed (92). At pH 7.4, the graft copolymers exhibited phase transition at a temperature similar to that of PNIPAM. Nevertheless, NIPAM copolymers are not generally recognized as safe (GRAS). This fact prompted investigators to synthesize similar copolymer structures using GRAS polymers. Since poloxamer and PAA components have approved regulatory status, it is expected that their graft-copolymers would be safe. Synthesis of the graft copolymer, PAA-g-poloxamer (Fig. 2.1J), was reported by Hoffman and coworkers (93-95). The proposed synthetic route involved a 3-step procedure with several intermediate steps of purification, making the process potentially problematic on an industrial scale. Subsequently, the synthesis of another graft copolymer, *i.e.* poloxamer-g-PAA (Fig. 2.1I), was described by Bromberg *et al.* (96-98). This single-step synthetic procedure was reproducible and scaleable. Work on this copolymer (Smart Hydrogel™) has been reviewed recently by Bromberg and Ron (99). While the PNIPAM-g-PAA graft copolymers precipitated out of solutions when temperature was raised above the LCST, dilute solutions (0.5-3 wt%) of PAA-g-poloxamer and poloxamer-g-PAA formed clear gels when the temperature increased from 4 to 37°C at pH 7.4 (94, 97, 98) (Fig. 2.7). Moreover, the critical gel concentration was considerably lower than that of the parent poloxamer.

Bromberg thoroughly studied the rheological properties of poloxamer-g-PAA hydrogels and showed that temperature-induced sol-gel transition and gel strength were concentration-dependent (100-102). An increase in polymer concentration resulted in lower transition temperature and higher gel strength. Besides polymer concentration, pH and salts influenced gelation properties (102). With rising pH, the onset of gelation was shifted to lower temperatures, and gel strength increased.

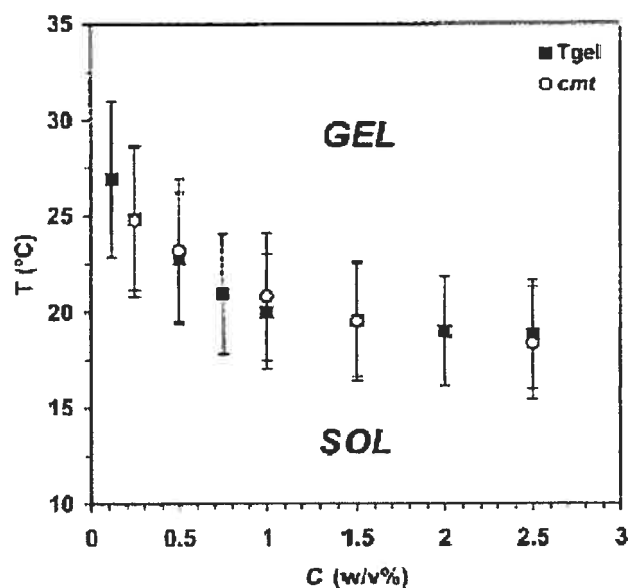


Figure 2.7 Phase diagram for aqueous solutions of poloxamer-g-PAA at pH 7.0.  $T_{gel}$  and  $cmt$  stand for the gel point and critical micellization temperature determined by the Winter-Chambon method and DSC, respectively. Reprinted with permission from ref. (102).

The data obtained by Bromberg suggested that gelation was driven by the formation of micelles that act as thermoreversible cross-links. The onset of gelation in poloxamer-g-PAA solutions occurred approximately at the critical micellization temperature of the parent poloxamer (97). Polymer aggregation indeed coincided with the onset of the relative viscosity increase (101). A negative change in heat capacity upon gelation suggested a decrease in the exposure of PPO segments to water (102).

The bioadhesive nature of this system (103) makes it interesting for a wide variety of applications. Hydrogels of poloxamer-g-PAA have been proposed for vaginal (104) and topical (105) drug administration. The pharmacokinetic profile of estradiol after vaginal delivery of poloxamer-g-PAA formulation was equivalent to that of Estrace<sup>®</sup> vaginal cream, which contains 5 times more drug. Potts *et al.* (106) examined this hydrogel in the treatment of gastro-oesophageal reflux by measuring its adherence to the oesophageal mucosa. This study revealed that 15% of the administered dose displayed prolonged retention in the oesophagus. In another investigation, it was shown that Smart Hydrogel<sup>™</sup> could sustain the release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and human insulin (107). At a polymer concentration of 5%, the release kinetics of LHRH followed a zero-order rate. Finally, preliminary animal toxicological studies showed the non-toxic nature of the copolymer administered topically, orally or to the eye (99).

## **2.7 Poly(ethylene oxide) / poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)**

Jeong and coworkers described different thermosensitive, biodegradable hydrogels based on poly(lactic acid). Block copolymer solutions of PEO and poly(L-lactic acid) were shown to be in the sol state at 45°C, and in the gel state at body temperature (108). However, the need to heat the solution limits the nature of the drugs that can be incorporated in this delivery system, and makes the injection procedure not practical. Later, PEO-*b*-(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)-*b*-PEO (PEO-PLGA-PEO) (Fig. 2.1K) triblock copolymer solutions were found to form, at room temperature, a free-flowing sol that became a transparent gel at 37°C (109, 110). PEO-PLGA-PEO (550-2810-550) exhibited a critical gel concentration of approximately 16 wt%.



PEO-PLGA-PEO polymers are amphiphilic and yield micelles in aqueous environments with the hydrophilic PEO occupying the outer shell region, and the hydrophobic PLGA constituting the inner core. Micelle formation was indeed confirmed by  $^{13}\text{C}$  NMR and dye solubilization studies (109). It was shown that the gels formed *via* a micellar aggregation mechanism. Abrupt changes in micellar diameter and aggregation number were demonstrated above  $30^{\circ}\text{C}$ , and the second virial coefficient decreased sharply at this temperature, indicating a sudden increase in polymer-polymer attraction (109). Other studies established that micelle-micelle clusters were formed through hydrophobic interactions between core phases (111). The latter mechanism differentiates these copolymers from poloxamers where gel formation is only associated with simple micellar entanglements. The gelling properties are influenced by PLGA or PEO proportions. The more hydrophobic the polymer, the lower the temperature and polymer concentration required to achieve the desired liquid crystalline structure (110).

*In vitro* studies revealed that the gel could sustain the release of ketoprofen (hydrophilic drug) and spironolactone (hydrophobic drug) for 2 weeks and 2 months, respectively (112). The subcutaneously-injected solution formed a hydrogel *in situ* (113). The latter maintained a 3-dimensional shape at the implant site, indicating that gelation was fast. The implant was strong enough to be easily taken out with forceps and persisted for more than 1 month with little or no tissue irritation at the injection site. As opposed to poloxamers, PEO-PLGA-PEO gels do not erode rapidly. Furthermore, due to their PLGA segments, they can be hydrolyzed *in vivo*.

Since the transition temperature of the triblock copolymers is quite sensitive to PEO length, it is difficult to modify polymer structure and still maintain gelation temperature around  $37^{\circ}\text{C}$ . To overcome the molecular weight limitation, Jeong *et al.* (114-117) developed graft copolymers based on PEO and PLGA. As with the PEO-PLGA-PEO system, PEO-g-PLGA (Fig. 2.1L) and

PLGA-g-PEO (Fig. 2.1M) micellized in water (114-116). The critical gel concentrations of both polymers were approximately 16 (114) and 22 wt% (116), respectively. The applicability of this new material as an *in situ*-forming device was assessed after subcutaneous injection into rats (116). Again, the implant was round-shaped, indicating fast gelation kinetics. *In vivo*, the PLGA-g-PEO depot persisted for about 3 months, whereas PEO-g-PLGA disappeared within a week. By mixing 2 polymers of PEO-g-PLGA and PLGA-g-PEO, the duration of depot could be adjusted between 1 week and 3 months. The grafted copolymer systems were evaluated for sustained insulin release and as a cell delivery matrix in cartilage repair (117). Insulin depots prepared from a 50/50 mixture of PEO-g-PLGA and PLGA-g-PEO showed a hypoglycemic effect over 5 days vs 16 days for PLGA-g-PEO. Injection of a chondrocyte cell suspension in PLGA-g-PEO into a cartilage defect effectively promoted cartilage repair in rabbits.

Low molecular weight PLGA-PEO-PLGA copolymers also exhibit reverse thermal gelation properties at concentrations between 10 and 30 wt% (118). This system, known as ReGel<sup>®</sup>, was evaluated as a pharmaceutical vehicle by Zentner *et al.* (119). *In vivo* biodegradation studies in rats revealed that the formulation was completely resorbed from the injection site within 4 to 6 weeks. *In vitro* release experiments showed sustained paclitaxel release over 50 days. This was in sharp contrast to the complete release of paclitaxel from poloxamer 407 hydrogel within 1 day. Direct intratumoral injection of paclitaxel-loaded ReGel<sup>®</sup> resulted in slow drug clearance from the injection site with minimal distribution into any organ. The efficacy of ReGel<sup>®</sup>/paclitaxel (OncoGel<sup>®</sup>) against human breast tumor xenografts (MDA231) was also superior to that achieved with a maximum tolerated dose of the commercial paclitaxel product (*i.e.* Taxol<sup>®</sup>). Moreover, the ReGel<sup>®</sup>/paclitaxel formulation was less toxic as treated animals showed no drug-related adverse effects, whereas in the Taxol<sup>®</sup> group, there was weight loss and 2 acute toxic deaths within 2 days of dosing. OncoGel<sup>®</sup> is MacroMed's lead product; it entered Phase II studies in the second quarter of 2003 (120). The ReGel<sup>®</sup> system has also been tested for the parenteral

delivery of insulin (121). After 1 injection in rats, elevated plasma insulin levels were maintained for at least 15 days (Fig. 2.8).

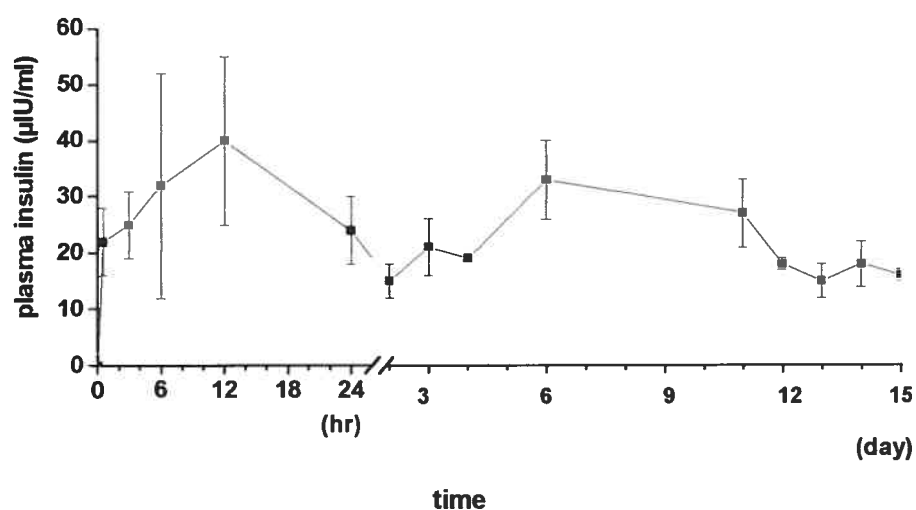


Figure 2.8 Plasma insulin levels of Sprague-Dawley rat after subcutaneous injection of the insulin/ReGel<sup>®</sup> formulation. Reprinted with permission from ref. (121).

## 2.8 Thermosensitive liposomes as a physical barrier between reactive species

In a series of studies, Messersmith and coworkers (122-126) exploited a rise in temperature to initiate a reaction cascade leading to the formation of a biomaterial *in situ*. Their approach was based on the use of temperature-sensitive liposomes to compartmentalize reactive species (Fig. 2.9A). The physical barrier imposed by the vesicle membrane prevented the chemical reaction from proceeding. Destabilization of the lipid membrane upon an increase in temperature triggered the reaction as reactive species escaped from the liposomes. The same strategy can be adopted to design thermoresponsive gels.

Alginates are linear, water-soluble polysaccharides composed of 1,4-linked  $\beta$ -D-mannuronic and  $\alpha$ -L-glucuronic acid units. One of the main biofunctional characteristics of alginates is their ability to form transparent or translucent gels in the presence of multivalent ions. Thus, thermoresponsive calcium-loaded liposomes were prepared and mixed with an alginate solution (123).  $\text{Ca}^{2+}$  sequestration within the liposomes prevented the ionic crosslinking of the polymer. The Ca-liposome/alginate mixture remained fluid when stored at 20°C. Gelation occurred upon heating the system above the liposome phase transition temperature due to the leakage of entrapped  $\text{Ca}^{2+}$ . At room temperature, however, after only 1 day of storage, a gradual increase in viscosity was observed, which eventually led to full gelation within 4-5 days. It was found that alginate triggered slow release of calcium from the liposomes at 20°C. Although the lack of stability imposes constraints on the storage time of the mixture, it does not necessarily preclude the use of such a system, since the 2 components can be mixed prior to injection.

Many biological processes are regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, indicating that  $\text{Ca}^{2+}$  release can be exploited to produce different types of biomaterials. Protein-based hydrogels were prepared by taking advantage of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzymes to catalyze enzyme-mediated crosslinking of macromolecular substrates. One such family of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteins are the transglutaminases. These enzymes catalyze the formation of crosslinks between glutamine- and lysine-containing proteins. Calcium-loaded, thermally-sensitive liposomes were used to activate hrFXIII, a calcium-dependent enzyme that catalyzes the crosslinking of fibrin during blood coagulation (123, 124). When calcium-loaded liposomes, fibrinogen, and hrFXIII were combined and heated to  $37^\circ\text{C}$ , gelation occurred within 10 min (Fig. 2.9B). Sandborn *et al.* (125) reported a system comprising thermosensitive, calcium-loaded liposomes, hrFXIII, thrombin and an enzymatic substrate based on a 4-arm PEO terminated with a 20mer peptide sequence derived from the  $\gamma$ -chain of fibrin. Upon heating the precursor solution to  $37^\circ\text{C}$ , a solid, enzymatically-crosslinked hydrogel formed within 9 min. Gelation was not reversible as the material remained in a gelled state after cooling to room temperature. Another study investigated the potential of the system to trigger the self-assembly of FEK16 (126), a 16-amino acid peptide that is highly soluble in pure water, but forms self-assembled aggregates in the presence of NaCl, KCl, and  $\text{CaCl}_2$ . Hydrogel formation was achieved when temperature-sensitive, calcium-loaded liposomes were suspended in aqueous solutions of FEK16 and subsequently warmed to  $37^\circ\text{C}$ . The main advantage of using peptide substrates as hydrogel crosslinks lies in their biodegradability. However, a possible immune response to the implant is a potential concern that should be addressed in the future.

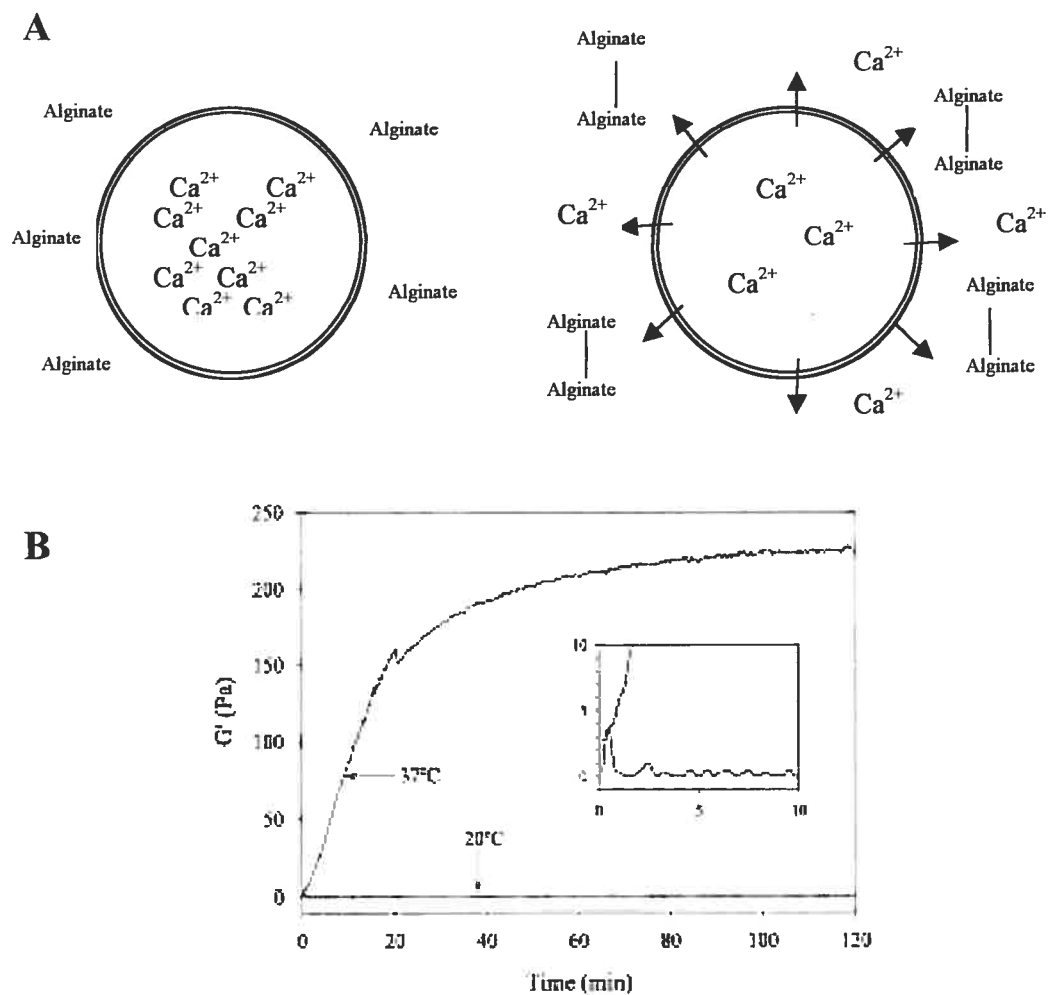


Figure 2.9 (A) Schematic illustration of thermally triggered alginate cross-linking. Adapted with permission from ref. 122. (B) Thermally-triggered gelation of TGase/fibrinogen/thermally-sensitive, calcium-loaded liposome precursor fluid. Reprinted with permission from ref. (123).

## 2.9 Miscellaneous

### 2.9.1 Poly(organophosphazene) derivatives

Recently, poly(organophosphazene) (PPZ) derivatives were shown to exhibit sol-gel phase transitions as a function of temperature. PPZ bearing methoxy-PEO and amino acid esters as substituents were synthesized by Song *et al.* (Fig. 2.1N) (127, 128). The polymers were hydrolytically degradable and displayed a LSCT in the 25.2-98.5°C range. The same group demonstrated that oligomeric cyclophosphazenes with proper orientation of substituents were also thermosensitive (Fig. 2.1P) (129). PPZ bearing  $\alpha$ -amino- $\omega$ -methoxy-PEO and hydrophobic L-isoleucine ethyl ester as side groups exhibited reversible sol-gel transition between 29 and 61°C depending on the structure (Fig. 2.1O) (130). Gelation was attributed to hydrophobic interactions between the side-chain fragments ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) of L-isoleucine ethyl ester.

### 2.9.2 Poly(1,2-propylene phosphate)

Lately, a new injectable temperature-sensitive hydrogel system was proposed by Wang *et al.* (131). The system is based on a synthetic polyanion, poly(1,2-propylene phosphate) (Fig. 2.1Q), that can be crosslinked by calcium ions. Solutions of poly(1,2-propylene phosphate) in water did not exhibit temperature-dependent phase transition. In the presence of  $\text{CaCl}_2$ , the polymer solutions remained liquid at room temperature, but gelled rapidly when heated. The sol-gel transition temperature was a function of polymer and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. The *in vitro* release study of lysozyme followed zero-order kinetics after a lag time of 1 h. Release was accompanied with decrosslinking of the gel, which was most likely due to  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion into the buffer.

## 2.10 Conclusion

Over the last decade, an impressive number of novel, thermosensitive, *in situ* gel-forming solutions have been described in the literature. Each system has its own advantages and drawbacks. The choice of a particular hydrogel depends on its intrinsic properties and envisaged therapeutic use. For instance, the formation of a transparent gel is particularly important when ophthalmic applications are considered. Non-biodegradable gels could prove useful for administration routes other than parenteral. Poloxamer hydrogels perhaps represent the most extensively studied systems. However, despite the clinical acceptance of poloxamers as solubilizer and thickening agents, these polymers have not met initial expectations as pharmaceutical and biomedical implants, mainly due to their non-biodegradability and inability to provide sustained drug delivery over more than just a few days. Recent developments in the design of poloxamer derivatives showed that some of these problems could be worked out. Polysaccharides usually demonstrate good biocompatibility and/or biodegradability, and their solutions are thermosensitive at low polymeric concentrations. However, these systems may not be adapted for the sustained release of hydrophilic, low molecular weight drugs because their large, water-filled pores permit rapid diffusion. On the other hand, they provide adequate scaffolds for cell growth and tissue repair. PEO/PLGA hydrogels are particularly attractive systems for pharmaceutical applications. They are biodegradable and generally have a good safety profile. Their composition can be tailored to provide drug delivery over weeks or months after parenteral extravascular administration.

## Acknowledgements

Financial support from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada, BioSyntech Inc. and the Canada Research Chair Program is acknowledged.



## 2.11 References

1. R.L. Dunn, J.P. English, D.R. Cowsar, D.P. Vanderbilt, Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, U. S. Patent 4, 938, 763 (1990).
2. M.L. Shively, B.A. Coonts, W.D. Renner, J.L. Southard, A.T. Bennett, Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system, *J. Controlled Release*. 33 (1995) 237-243.
3. R.E. Eliaz, J. Kost, Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 388-396.
4. B.O. Haglund, R. Joshi, K.J. Himmelstein, An in situ gelling system for parenteral delivery, *J. Controlled Release*. 41 (1996) 229-235.
5. R.E. Eliaz, F.C. Szoka, Robust and prolonged gene expression from injectable polymeric implants, *Gene Ther.* 9 (2002) 1230-1237.
6. Y. An, J.A. Hubbell, Intraarterial protein delivery via intimately-adherent bilayer hydrogels, *J. Controlled Release*. 64 (2000) 205-215.
7. K. Ono, Y. Saito, H. Yura, K. Ishikawa, A. Kurita, T. Akaike, M. Ishihara, Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive, *J. Biomed. Mater. Res.* 49 (2000) 289-295.
8. M. Ishihara, K. Nakanishi, K. Ono, M. Sato, M. Kikuchi, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Uenoyama, A. Kurita, Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, *Biomaterials*. 23 (2002) 833-840.
9. M. Ishihara, K. Obara, T. Ishizuka, M. Fujita, M. Sato, K. Masuoka, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Kikuchi, A. Kurita, Controlled release of fibroblast growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and subsequent effect on in vivo vascularization, *J. Biomed. Mater. Res.* 64A (2002) 551-559.
10. K. Obara, M. Ishihara, T. Ishizuka, M. Fujita, Y. Ozeki, T. Maehara, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Kikuchi, A. Kurita, Photocrosslinkable

chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired *db/db* mice, *Biomaterials*. 24 (2003) 3437-3444.

11. A.K. Burkoth, K.S. Anseth, A review of photocrosslinked polyanhydrides: in situ forming degradable networks, *Biomaterials*. 21 (2000) 2395-2404.
12. A. Rozier, C. Mazuel, J. Grove, B. Plazonnet, Gelrite: A novel, ion-activated, in-situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 163-168.
13. S. Cohen, E. Lobel, A. Trevogoda, Y. Peled, A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye, *J. Controlled Release*. 44 (1997) 201-208.
14. S. Kumar, B.O. Haglund, K.J. Himmelstein, In situ-forming gels for ophthalmic drug delivery, *J. Ocular Pharmacol.* 10 (1994) 47-56.
15. B. Srividya, R.M. Cardoza, P.D. Amin, Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system, *J. Controlled Release*. 73 (2001) 205-211.
16. L.D. Taylor, L.D. Cerankowski, Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions - A study of lower consolute behavior, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 13 (1975) 2551-2570.
17. M. Heskins, J.E. Guillet, Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide), *J. Macromol. Sci. Chem.* A2 (1968) 1441-1455.
18. H.G. Schild, Poly(*N*-isopropylacrylamide): Experiment, theory and application, *Prog. Polym. Sci.* 17 (1992) 163-249.
19. A.S. Hoffman, Intelligent polymers, in: K. Park (Ed.), *Controlled drug delivery - Challenges and strategies*, American Chemical Society, Washington, 1997, p. 485-498.
20. K. Mortensen, J.S. Pederson, Structural study on the micelle formation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in aqueous solution, *Macromolecules*. 26 (1993) 805-812.
21. W.F. Harrington, P.H. Von Hippel, The structure of collagen and gelatin, *Adv. Protein Chem.* 16 (1961) 1-138.

22. N.S. Anderson, J.W. Campbell, M.M. Harding, D.A. Rees, J.W.B. Samuel, X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: Double helix models for  $\kappa$ - and  $\iota$ -carrageenans, *J. Mol. Biol.* 45 (1969) 85-99.
23. E. Heymann, Studies on sol-gel transformations. I. The inverse sol-gel transformation of methylcellulose in water, *Trans. Faraday Soc.* 31 (1935) 846-864.
24. N. Sarkar, Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropyl methylcellulose, *J. Appl. Polym. Sci.* 24 (1979) 1073-1087.
25. M.C. Tate, D.A. Shear, S.W. Hoffman, D.G. Stein, M.C. LaPlaca, Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury, *Biomaterials.* 22 (2001) 1113-1123.
26. A. Carlsson, G. Karlström, B. Lindman, O. Stenberg, Interaction between ethyl(hydroxyethyl)cellulose and sodium dodecyl sulphate in aqueous solution, *Colloid Polym. Sci.* 266 (1988) 1031-1036.
27. A. Carlsson, G. Karlström, B. Lindman, Thermal gelation of nonionic cellulose ethers and ionic surfactants in water, *Colloids Surf.* 47 (1990) 147-165.
28. B. Nystrom, H. Walderhaug, F.K. Hansen, Rheological behavior during thermoreversible gelation of aqueous mixtures of ethyl(hydroxyethyl)cellulose and surfactants, *Langmuir.* 11 (1995) 750-757.
29. A. Carlsson, B. Lindman, T. Watanabe, K. Shirahama, Polymer-surfactant interactions. Binding of N-tetradecylpyridinium bromide to ethyl(hydroxyethyl)cellulose, *Langmuir.* 5 (1989) 1250-1252.
30. B. Lindman, A. Carlsson, G. Karlström, M. Malmsten, Nonionic polymers and surfactants - some anomalies in temperature dependence and in interactions with ionic surfactants, *Adv. Colloid Interface Sci.* 32 (1990) 183-203.
31. M. Scherlund, A. Brodin, M. Malmsten, Nonionic cellulose ethers as potential drug delivery systems for periodontal anesthesia, *J. Colloid Interface Sci.* 229 (2000) 365-374.
32. M. Shirakawa, K. Yamatoya, K. Nishinari, Tailoring xyloglucan properties using an enzyme, *Food Hydrocolloids.* 12 (1998) 25-28.

33. S. Miyazaki, F. Suisha, N. Kawasaki, M. Shirakawa, K. Yamatoya, D. Attwood, Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery, *J. Controlled Release*. 56 (1998) 75-83.
34. F. Suisha, N. Kawasaki, S. Miyazaki, M. Shirakawa, K. Yamatoya, M. Sasaki, D. Attwood, Xyloglucan gels as sustained release vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C, *Int. J. Pharm.* 172 (1998) 27-32.
35. N. Kawasaki, R. Ohkura, S. Miyazaki, Y. Uno, S. Sugimoto, D. Attwood, Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery, *Int. J. Pharm.* 181 (1999) 227-234.
36. S. Miyazaki, N. Kawasaki, K. Endo, D. Attwood, Oral sustained delivery of theophylline from thermally reversible xyloglucan gels in rabbits, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 1185-1191.
37. S. Miyazaki, S. Suzuki, N. Kawasaki, K. Endo, A. Takahashi, D. Attwood, In situ gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride, *Int. J. Pharm.* 229 (2001) 29-36.
38. A. Takahashi, S. Suzuki, N. Kawasaki, W. Kubo, S. Miyazaki, R. Loeberberg, J. Bachynsky, D. Attwood, Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from in situ gelling xyloglucan formulations in rats, *Int. J. Pharm.* 246 (2002) 179-186.
39. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials*. 21 (2000) 2155-2161.
40. A. Chenite, M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput, N. Kandani, Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydr. Polym.* 46 (2001) 39-47.
41. E. Ruel-Gariépy, A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis, J.C. Leroux, Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs, *Int. J. Pharm.* 203 (2000) 89-98.
42. E. Ruel-Gariépy, G. Leclair, P. Hildgen, A. Gupta, J.C. Leroux, Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules, *J. Controlled Release*. 82 (2002) 373-383.

43. E. Ruel-Gariépy, M. Shive, A. Bichara, M. Berrada, D. Le Garrec, A. Chenite, J.C. Leroux, A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 53-63.
44. C.D. Hoemann, J. Sun, A. Légaré, M.D. McKee, P. Ranger, M.D. Buschmann, A thermosensitive polysaccharide gel for cell delivery in cartilage repair, *Trans. Orthopaedic Res. Soc.* 26 (2001) 626.
45. C.D. Hoemann, M. Hurtig, J. Sun, D. McWade, E. Rossomacha, M.S. Shive, M.D. McKee, M.D. Buschmann, Full-thickness cartilage repair using an injectable chitosan scaffold, *BST-CarGel*, 3rd Annual Engineering Tissue Growth. 2003. Pittsburgh, PA.
46. G. Molinaro, J.C. Leroux, J. Damas, A. Adam, Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials, *Biomaterials.* 23 (2002) 2717-2722.
47. C. Jarry, C. Chaput, A. Chenite, M.A. Renaud, M. Buschmann, J.C. Leroux, Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.).* 58 (2001) 127-135.
48. C. Jarry, J.C. Leroux, J. Haeck, C. Chaput, Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: Effect on thermogelling chitosan- $\beta$ -glycerophosphate systems, *Chem. Pharm. Bull.* 50 (2002) 1335-1340.
49. A.S. Hoffman, A. Afrassiabi, L.C. Dong, Thermally reversible hydrogels: II. Delivery and selective removal of substances from aqueous solutions, *J. Controlled Release.* 4 (1986) 213-222.
50. S. Hirotsu, Y. Hirokawa, T. Tanaka, Volume-phase transitions of ionized *N*-isopropylacrylamide gels, *J. Chem. Phys.* 87 (1987) 1392-1395.
51. H. Feil, Y.H. Bae, J. Feijen, S.W. Kim, Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of *N*-isopropylacrylamide copolymers, *Macromolecules.* 26 (1993) 2496-2500.
52. C.K. Han, Y.H. Bae, Inverse thermally-reversible gelation of aqueous *N*-isopropylacrylamide copolymer solutions, *Polymer.* 39 (1998) 2809-2814.
53. B. Vernon, A. Gutowska, S.W. Kim, Y.H. Bae, Thermally reversible polymer gels for biohybrid artificial pancreas, *Macromol. Symp.* 109 (1996) 155-167.
54. Y.H. Bae, B. Vernon, C.K. Han, S.W. Kim, Extracellular matrix for a rechargeable cell delivery system, *J. Controlled Release.* 53 (1998) 249-258.

55. B. Vernon, S.W. Kim, Y.H. Bae, Insulin release from islets of Langerhans entrapped in a poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylic acid) polymer gel, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* 10 (1999) 183-198.
56. H. Gappa, M. Baudys, J.J. Koh, S.W. Kim, Y.H. Bae, The effect of zinc-crystallized glucagon-like peptide-1 on insulin secretion of macroencapsulated pancreatic islets, *Tissue Eng.* 7 (2001) 35-44.
57. S.Y. Chae, S.W. Kim, Y.H. Bae, Effects of cross-linked hemoglobin on functionality and viability of microencapsulated pancreatic islets, *Tissue Eng.* 8 (2002) 379-394.
58. S.Y. Chae, S.W. Kim, Y.H. Bae, Bioactive polymers for biohybrid artificial pancreas, *J. Drug Targeting.* 9 (2001) 473-484.
59. K.H. Park, Y.H. Bae, Phenotype of hepatocyte spheroids in Arg-Gly-Asp (RGD) containing a thermo-reversible extracellular matrix, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 1473-1478.
60. H.H. Lin, Y.L. Cheng, In-situ thermoreversible gelation of block and star copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(*N*-isopropylacrylamide) of varying architectures, *Macromolecules.* 34 (2001) 3710-3715.
61. J. Rassing, D. Attwood, Ultrasonic velocity and light-scattering studies on the polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer Pluronic F127 in aqueous solution, *Int. J. Pharm.* 13 (1983) 47-55.
62. Z. Zhou, B. Chu, Anomalous association behavior of an ethylene oxide/propylene oxide ABA block copolymer in water, *Macromolecules.* 20 (1987) 3089-3091.
63. Z. Zhou, B. Chu, Light-scattering study on the association behavior of triblock polymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution, *J. Colloid Interface Sci.* 126 (1988) 171-180.
64. G. Wanka, H. Hoffman, W. Ulbricht, The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution, *Colloid Polym. Sci.* 268 (1990) 101-117.
65. K. Mortensen, Block copolymer in aqueous solution: Micelle formation and hard-sphere crystallization, *Progr. Colloid Polym. Sci.* 93 (1993) 72-75.
66. K. Schillén, O. Glatter, W. Brown, Characterization of a PEO-PPO-PEO block copolymer system, *Progr. Colloid Polym. Sci.* 93 (1993) 66-71.

67. M. Bohorquez, C. Koch, T. Trygstad, N. Pandit, A study of the temperature-dependent micellization of pluronic F127, *J. Colloid Interface Sci.* 216 (1999) 34-40.
68. A. Cabana, A. Ait-Kadi, J. Juhasz, Study of the gelation process of polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 190 (1997) 307-312.
69. I.R. Schmolka, Artificial skin 1. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns, *J. Biomed. Mater. Res.* 6 (1972) 571-582.
70. S. Miyazaki, S. Takeuchi, C. Yokouchi, M. Takada, Pluronic F-127 gels as a vehicle for topical administration of anticancer agents, *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 4205-4208.
71. T.P. Johnston, S.C. Miller, Inulin disposition following intramuscular administration of an inulin/poloxamer gel matrix, *J. Parent. Sci. Technol.* 43 (1989) 279-286.
72. M. Katakam, W.R. Ravis, A.K. Banga, Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamer gels, *J. Controlled Release.* 49 (1997) 21-26.
73. M.L. Veyries, G. Couarraze, S. Geiger, F. Agnely, L. Massias, B. Kunzli, F. Faurisson, B. Rouveix, Controlled release of vancomycin from poloxamer gels, *Int. J. Pharm.* 192 (1999) 183-193.
74. A. Paavola, I. Kilpelainen, J. Yliruusi, P. Rosenberg, Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia, *Int. J. Pharm.* 199 (2000) 85-93.
75. J.G.W. Wenzel, K.S.S. Balaji, K. Koushik, C. Navarre, S.H. Duran, C.H. Rahe, U.B. Kompella, Pluronic F127 gel formulations of Deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle, *J. Controlled Release.* 85 (2002) 51-59.
76. L. Zhang, D.L. Parsons, C. Navarre, U.B. Kompella, Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur, *J. Controlled Release.* 85 (2002) 73-81.
77. H.G. Choi, J.H. Jung, J.M. Ryu, S.J. Yoon, Y.K. Oh, C.K. Kim, Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository, *Int. J. Pharm.* 165 (1998) 33-44.

78. J.M. Ryu, S.J. Chung, M.H. Lee, C.K. Kim, C.K. Shim, Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum, *J. Controlled Release*. 59 (1999) 163-172.
79. J.Y. Chang, Y.K. Oh, H.G. Choi, Y.B. Kim, C.K. Kim, Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginals gels in physiological conditions, *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 155-163.
80. J.Y. Chang, Y.K. Oh, H.S. Kong, E.J. Kim, D.D. Jang, K.T. Nam, C.K. Kim, Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis, *J. Controlled Release*. 82 (2002) 39-50.
81. S.C. Shin, C.W. Cho, I.J. Oh, Enhanced efficacy by percutaneous absorption of piroxicam from the poloxamer gel in rats, *Int. J. Pharm.* 193 (2000) 213-218.
82. J. Liaw, Y.C. Lin, Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl, *J. Controlled Release*. 68 (2000) 273-282.
83. A.H. El-Kamel, In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate, *Int. J. Pharm.* 241 (2002) 47-55.
84. G. Wei, H. Xu, P.T. Ding, S.M. Li, J.M. Zheng, Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies, *J. Controlled Release*. 83 (2002) 65-74.
85. T.P. Johnston, S.C. Miller, Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use, *J. Parent. Sci. Technol.* 39 (1985) 83-88.
86. Z.G.M. Wout, E.A. Pec, J.A. Maggiore, R.H. Williams, P. Palicharla, T.P. Johnston, Poloxamer 407-mediated changes in plasma cholesterol and triglycerides following intraperitoneal injection to rats, *J. Parent. Sci. Technol.* 46 (1992) 192-200.
87. W.K. Palmer, E.E. Emeson, T.P. Johnston, Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57BL/6 mouse, *Atherosclerosis*. 136 (1998) 115-123.
88. T.P. Johnston, W.K. Palmer, Mechanism of poloxamer 407-induced hypertriglyceridemia in the rat, *Biochem. Pharmacol.* 46 (1993) 1037-1042.
89. J.M. Blonder, L. Baird, J.C. Fulfs, G.J. Rosenthal, Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel, *Life Sci.* 65 (1999) PL 261-266.



90. X. Zhao, J. Yan, W. Battle, S. Allums, M. Bentley, Oligomers of poloxamer 407 as degradable thermal sensitive depot materials for sustained drug release, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 30 (2003) 167.
91. D. Cohn, A. Sosnik, A. Levy, Improved reverse thermo-responsive polymeric systems, *Biomaterials.* 24 (2003) 3707-3714.
92. G. Chen, A.S. Hoffman, Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transition over a wide range of pH, *Nature.* 373 (1995) 49-52.
93. A.S. Hoffman, G. Chen, S. Kaang, D.T. Priebe, New bioadhesive polymer compositions for prolonged drug release in the eye, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22 (1995) 159-160.
94. A.S. Hoffman, G. Chen, X. Wu, Z. Ding, B. Kabra, K. Randeri, M. Schiller, E. Ron, N. Peppas, C. Brazel, Graft copolymers of PEO-PPO-PEO triblock polyethers on bioadhesive polymer backbones: Synthesis and properties, *Polym. Prepr.* 38 (1997) 524-525.
95. A.S. Hoffman, G. Chen, Block and graft copolymers and methods relating thereto, *Int. Pat. Appl. W/O 95/24430* (1995)
96. L. Bromberg, E.C. Lupton, M.E. Schiller, M.J. Timm, G.W. McKinney, M. Orkisz, B. Hand, Responsive polymer networks and methods of their use, *Int. Pat. Appl. WO 97/00275* (1997).
97. L. Bromberg, Novel family of thermogelling materials via C-C bonding between poly(acrylic acid) and poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide), *J. Phys. Chem. B.* 102 (1998) 1956-1963.
98. L. Bromberg, Polyether-modified poly(acrylic acid): Synthesis and applications, *Ind. Eng. Chem. Res.* 37 (1998) 4267-4274.
99. L.E. Bromberg, E.S. Ron, Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery, *Adv. Drug Del. Rev.* 31 (1998) 197-221.
100. L. Bromberg, Scaling of rheological properties of hydrogels from associating polymers, *Macromolecules.* 31 (1998) 6148-6156.
101. L. Bromberg, Self-assembly in aqueous solutions of polyether-modified poly(acrylic acid), *Langmuir.* 14 (1998) 5806-5812.
102. L. Bromberg, Properties of aqueous solutions and gels of poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide)-*g*-poly(acrylic acid), *J. Phys. Chem. B.* 102 (1998) 10736-10744.

103. L.E. Bromberg, M.J. Orkisz, E.S. Ron, Bioadhesive properties of polyethylene-*b*-polyoxypropylene-*b*-polyoxyethylene-*g*-poly(acrylic acid) polymers (Smart Hydrogel<sup>TM</sup>), Polym. Prepr. 38 (1997) 626-627.
104. E.S. Ron, L. Bromberg, S. Luczak, M. Kearney, D. Deaver, M. Schiller, Smart Hydrogel: A novel mucosal delivery system, Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24 (1997) 407-408.
105. E.S. Ron, E.J. Roos, A.K. Staples, L.E. Bromberg, M.E. Schiller, Interpenetrating polymer networks for sustained dermal delivery, Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 23 (1996) 128-129.
106. A.M. Potts, S. Jackson, N. Washington, P. Gilchrist, E.S. Ron, M. Schiller, C.G. Wilson, In vivo determination of the oesophageal retention of Smart Hydrogel, Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24 (1997) 335-336.
107. L.E. Bromberg, T.H.E. Mendum, M.J. Orkisz, M.E. Schiller, E.C. Lupton, E.S. Ron, Polyoxyethylene-*b*-polyoxypropylene-*b*-polyoxyethylene-*g*-poly(acrylic acid) polymers (Smart Hydrogel<sup>TM</sup>) as a carrier in controlled delivery of proteins and peptides, Polym. Prepr. 38 (1997) 602-603.
108. B. Jeong, Y.H. Bae, D.S. Lee, S.W. Kim, Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, Nature. 388 (1997) 860-862.
109. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Biodegradable thermosensitive micelles of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, Colloids Surf., B. 16 (1999) 185-193.
110. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions, Macromolecules. 32 (1999) 7064-7069.
111. K.W. Kwon, M.J. Park, Y.H. Bae, H.D. Kim, K. Char, Gelation behavior of PEO-PLGA-PEO triblock copolymers in water, Polymer. 43 (2002) 3353-3358.
112. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, J. Controlled Release. 63 (2000) 155-163.
113. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof, J. Biomed. Mater. Res. 50 (2000) 171-177.

114. B. Jeong, M.R. Kibbey, J.C. Birnbaum, Y.Y. Won, A. Gutowska, Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA, *Macromolecules*. 33 (2000) 8317-8322.
115. B. Jeong, L.Q. Wang, A. Gutowska, Biodegradable thermoreversible gelling PLGA-g-PEG copolymers, *Chem. Commun.* (2001) 1516-1517.
116. Y.M. Chung, K.L. Simmons, A. Gutowska, B. Jeong, Sol-gel transition temperature of PLGA-g-PEG aqueous solutions, *Biomacromolecules*. 3 (2002) 511-516.
117. B. Jeong, K.M. Lee, A. Gutowska, Y.H. An, Thermogelling biodegradable copolymer aqueous solutions for injectable protein delivery and tissue engineering, *Biomacromolecules*. 3 (2002) 865-868.
118. R.C. Rathi, G.M. Zentner, Biodegradable low molecular weight triblock poly(lactide-co-glycolide) polyethylene glycol copolymers having reverse thermal gelation properties, U.S. Patent 6,004,573 (1999).
119. G.M. Zentner, R. Rathi, C. Shih, J.C. McRea, M.H. Seo, H. Oh, B.G. Rhee, J. Mestecky, Z. Moldoveanu, M. Morgan, S. Weitman, Biodegradable block copolymers for drug delivery of proteins and water-insoluble drugs, *J. Controlled Release*. 72 (2001) 203-215.
120. K.D. Fowers, M. Baudys, R. Rathi, C. Shih, Thermally reversible gelling materials for safe and versatile depot delivery, *Drug Del. Technol.* 3 (2003) 58-64.
121. Y.J. Kim, S. Choi, J.J. Koh, M. Lee, K.S. Ko, S.W. Kim, Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer, *Pharm. Res.* 18 (2001) 548-550.
122. P.B. Messersmith, S. Starke, Thermally triggered calcium phosphate formation from calcium-loaded liposomes, *Chem. Mater.* 10 (1998) 117-124.
123. E. Westhaus, P.B. Messersmith, Triggered release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogel, *Biomaterials*. 22 (2001) 453-462.
124. E. Westhaus, P.B. Messersmith, Thermally triggered enzymatic crosslinking of proteins for in-situ gelation, *Trans. Soc. Biomaterials*, 25<sup>th</sup> Annual Meeting (1999) 247.

125. T.J. Sanborn, P.B. Messersmith, A.E. Barron, In situ crosslinking of a biomimetic peptide-PEG hydrogel via thermally triggered activation of factor XIII, *Biomaterials*. 23 (2002) 2703-2710.
126. J.H. Collier, B.H. Hu, J.W. Ruberti, J. Zhang, P. Shum, D.H. Thompson, P.B. Messersmith, Thermally and photochemically triggered self-assembly of peptide hydrogels, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 9463-9464.
127. S.C. Song, S.B. Lee, J.I. Jin, Y.S. Sohn, A new class of biodegradable thermosensitive polymers. I. Synthesis and characterization of poly(organophosphazenes) with methoxy-poly(ethylene glycol) and amino acid esters as side groups, *Macromolecules*. 32 (1999) 2188-2193.
128. S.B. Lee, S.C. Song, J.I. Jin, Y.S. Sohn, A new class of biodegradable thermosensitive polymers. 2. Hydrolytic properties and salt effect on the lower critical solution temperature of poly(organophosphazenes) with methoxypoly(ethylene glycol) and amino acid esters as side groups, *Macromolecules*. 32 (1999) 7820-7827.
129. S.B. Lee, S.C. Song, J.I. Jin, Y.S. Sohn, Thermosensitive cyclotriphosphazenes, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 8315-8316.
130. B.H. Lee, Y.M. Lee, Y.S. Sohn, S.C. Song, A thermosensitive poly(organophosphazene) gel, *Macromolecules*. 35 (2002) 3876-3879.
131. J. Wang, D.D.N. Sun, K.W. Leong, Injectable polyphosphate hydrogel, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 30 (2003) 140.
132. J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 189-198.
133. M.M. Amiji, P.K. Lai, D.B. Shenoy, M. Rao, Intratumoral administration of paclitaxel in an in situ gelling poloxamer 407 formulation, *Pharm. Dev. Tech.* 7 (2002) 195-202.

## **CHAPITRE 3**

### **CHARACTERIZATION OF THERMOSENSITIVE CHITOSAN GELS FOR THE SUSTAINED DELIVERY OF DRUGS**

Reprinted from International Journal of Pharmaceutics 203 (2000) 89-98 with permission from Elsevier.

### 3.1 Abstract

The aim of this study was to investigate the physical properties of a chitosan/glycerophosphate (GP) thermosensitive solution which gels at 37°C and evaluate the *in vitro* release profiles of different model compounds. The gelation rate was dependent on the temperature and on the chitosan deacetylation degree. The solution containing 84%-deacetylated chitosan could be stored 3 months at 4°C without apparent change in viscosity. The *in vitro* release profiles of the model compounds depended on the presence of GP in the chitosan solution, on their molecular weight and on the presence of lysozyme in the release media. They were not affected by the electrostatic charge of the model compound when present at low concentrations. During the first 4 hours, the release was accompanied by a substantial loss of the gel weight which was mainly attributed to the leaching of water and excess GP. Scanning electron micrographs revealed that the solutions yield gels with a highly porous structure after 24 hours of

exposure to a continuous flow of phosphate buffered saline. These results indicate that the chitosan/GP thermosensitive solutions gel rapidly at body temperature, can remain in the sol state at 4°C and can sustain the delivery of macromolecules.

**Keywords:** chitosan, thermosensitivity, hydrogel, sustained-delivery, macromolecule

### 3.2 Introduction

In recent years, advances in biotechnology have resulted in a great variety of new pharmaceutically active molecules such as recombinant peptides and proteins. So far, for the patient, the most effective delivery route for the administration of macromolecules is the parenteral one. Most polymeric systems used for the extravascular parenteral delivery of drugs or vaccines are microspheres (1) or implants (2,3). In those systems, the active compound is generally encapsulated by using organic solvents or by submitting it to relatively high temperatures which can cause a loss of activity. Moreover, the insert of an implant requires surgery which adds to the costs and the risks of this system. Those problems oriented research towards injectable thermosensitive in situ gelling formulations. Some polymers in aqueous solutions are known to exhibit temperature-dependent reversible sol-gel transitions. The polymeric solutions can be injected while kept above or below their transition temperature and form a gel as they reach body temperature. The most studied thermosensitive polymers are the poloxamers which are poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers (4-6). Those polymers exist as a mobile viscous liquid at reduced temperatures but form a rigid semisolid gel network with an increase in temperature. Unfortunately, poloxamer gels are obtained at high polymer concentrations only (between 20% and 30%) (7) and have been shown to erode rapidly (8). Also, poloxamers are not biodegradable and can cause hyperlipidemia in rats (9). Copolymers of *N*-isopropylacrylamide also

exhibit a phase transition around body temperature (10-13) but they are not biodegradable and toxicity data is scarce. Recently, aqueous solutions of block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(lactic acid) have been described (14). They exist in the sol state at temperatures around 45°C and gel upon cooling to body temperature. Even though those copolymers are biocompatible and biodegradable, the need to heat the solution to incorporate the drug and inject the system makes this approach less practical. Polysaccharides also can form thermosensitive systems. For example, partially degraded xyloglucan forms gels at concentrations between 1 and 2% (w/w) when their temperature is raised above 22 to 27°C (15). As well, an aqueous solution of ethyl(hydroxyethyl) cellulose in the presence of an ionic surfactant can form a physically cross-linked network at temperatures around 30-40°C (16). The xyloglucan system is interesting because of the very low concentration of polymer involved but the low transition temperature prevents an easy handling of the solution at room temperature. The second polysaccharide system has the advantage of having a transition temperature closer to body temperature but it must be kept in mind that ionic surfactants are tolerated *in vivo* only at a relatively low dose (17).

Chitosan, a polysaccharide derived from crustacean shells by deacetylation of naturally occurring chitin, is currently being investigated for many pharmaceutical applications (18-20). It is a biocompatible and biodegradable copolymer of glucosamine and *N*-acetyl glucosamine (21-23). It has been known to be digestible by lysozyme according to the amount of *N*-acetyl groups and their distribution in the backbone (24-27). Chitosan is insoluble at neutral and alkaline pH values. Chitosans with a degree of deacetylation of about 85% have been found to be soluble only up to a pH in the vicinity of 6.2 (28). When the pH is brought above this value, the system forms a hydrated gel-like precipitate. We have recently found that when a polyol counterionic monohead salt is used to neutralize the chitosan solution, the latter can remain liquid for long periods of time at or below room temperature. The system can then have a pH value within a physiologically acceptable neutral range (6.8 to 7.2) and it is only the temperature of the milieu that determines the liquid or gel



state; gel formation being observed upon an increase in temperature (29). The aim of this study was to investigate the physical properties of chitosan-based thermosensitive solutions and evaluate the *in vitro* release profiles of model compounds.

### 3.3 Materials and methods

#### 3.3.1 Materials

The medium molecular weight chitosan was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI). The chitosan hydrochlorides Protasan® UP CL213 and UP CL214 were obtained from Pronova Biopolymer A.S. (Oslo, Norway). The chitosan hydrochloride CL213 ( $M_w$  421 800) was 84% deacetylated (C84) and the chitosan hydrochloride CL214 ( $M_w$  455 200) was 95% deacetylated (C95). Glycerophosphate containing 50%  $\beta$ -isomer and 50% DL- $\alpha$ -isomer ( $\alpha$ - $\beta$ -GP),  $\beta$ -glycerophosphate ( $\beta$ -GP), calcein, chlorpheniramine maleate, fluoresceine isothiocyanate dextrans (FITC-dextran) and fluoresceine isothiocyanate albumin (FITC-albumin) were from Sigma (St. Louis, MO). Methylene blue and lysozyme were purchased from Fisher (Fairlawn, NJ) and Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), respectively. All other chemicals were reagent grade. All products were used as received. Deionized distilled water from a Milli-Q water system of Millipore (Fisher Scientific Limited, Nepean, On, Canada) was used to prepare all aqueous solutions.

### **3.3.2 Preparation of the chitosan/glycerophosphate solution (C/GP solution)**

A 1.8% (w/w) chitosan solution was prepared in 0.1M acetic acid or deionized distilled water with the medium molecular weight chitosan and the chitosan hydrochlorides (C84 and C95), respectively. The chitosan powder was progressively added to the solvent under stirring and mixing was carried on for one hour. A GP aqueous solution 45% (w/w) was prepared and chilled along with the chitosan solution in an ice bath for 15 minutes. The cold GP solution was added dropwise to the cold chitosan solution with stirring and the final solution was mixed another 10 minutes. The final solution contained 7.27% (w/w) GP (29). The  $\alpha$ - $\beta$ -GP was used with the medium molecular weight chitosan and the  $\beta$ -GP was used with the chitosan hydrochlorides because the  $\alpha$ - $\beta$ -GP is incompatible with the chitosan hydrochlorides (Protasan®).

### **3.3.3 Rheological measurements**

The rheology study was carried out on a Bohlin CVO rheometer (Bohlin Instruments, Cranbury, NJ) equipped with a coaxial-cylinder C-25 geometry in oscillatory mode immediately after preparation of the C/GP solution. The changes in elastic modulus and phase angle were recorded as a function of time at  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . The frequency was fixed at 1.0 Hz during the measurements. The acquisition rate was set up at one point per 13 seconds. For comparison purposes, the time needed to reach a phase angle of  $45^\circ$  was taken as a measure of the beginning of gelation.

### 3.3.4 Stability of C/GP solutions

A C/GP solution using C84 and a C/GP solution using a 1:1 (w/w) mixture of C84 and C95 were prepared. The solutions were stored at either 4°C or room temperature. At different times, the viscosity was measured on a Brookfield RVDV-II+ viscosimeter (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Stoughton, MA) using a cone-plane CP-52 geometry at  $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$ .

### 3.3.5 *In vitro* release studies

The model compounds were solubilized in deionized distilled water and mixed at different loadings with 3.0 g of chitosan solution with or without GP at room temperature. Samples of 300 mg were placed into continuous flow (10 mL/h) thermostated cells (30) and the release was monitored in phosphate buffered saline (PBS) at  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  by spectrophotometry on a Hitachi U-200 spectrophotometer (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) or by spectrofluorimetry on a Aminco-Bowman Series 2 fluorimeter (Spectronics Instruments Inc., Rochester, NY). The area of the gel exposed was  $0.8\text{ cm}^2$ .

### 3.3.6 Mass loss

C/GP solutions were placed into continuous flow (10 mL/h) thermostated cells under the same conditions used in the release studies. At predetermined time intervals, the gels were taken out from the cells, gently blotted and weighed. Then, they were dried in an oven at  $80^\circ\text{C}$  for 48 h and weighed again.

### **3.3.7 Scanning electron microscopy (SEM)**

A C/GP solution using C84 or a 1:1 (w/w) mixture of C84 and C95 was prepared. Samples (300 mg) were placed into continuous flow (10 mL/h) thermostated cells under the same conditions used for the release studies. At predetermined time intervals, the gels were removed, gently rinsed with distilled water, frozen in liquid nitrogen and freeze-dried for 48 h (Freezone, Labconco, Kansas City, MO). The samples were coated with gold/paladium and the surfaces were examined using a Jeol JSM840 electron microscope (Jeol, Boston, MA).

### **3.3.8 Statistical analysis**

Data are reported as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance ( $p < 0.05$ ) was determined using one-way ANOVA and Tukey Pairwise Comparison or Student's t-test.

### 3.4 Results

#### 3.4.1 Rheological measurements

Fig. 3.1 shows the rheological behavior of two C/GP solutions at  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . An increase of the elastic modulus clearly indicates that the liquid solution is turning into a solid-like gel. This transformation from solution to gel took approximately 5 minutes for the C/GP solution made of a 1:1 (w/w) mixture of C84 and C95 and approximately 140 minutes for the C/GP solution made of C84. The elastic modulus reached higher values in the case of the C84:C95/GP solution.

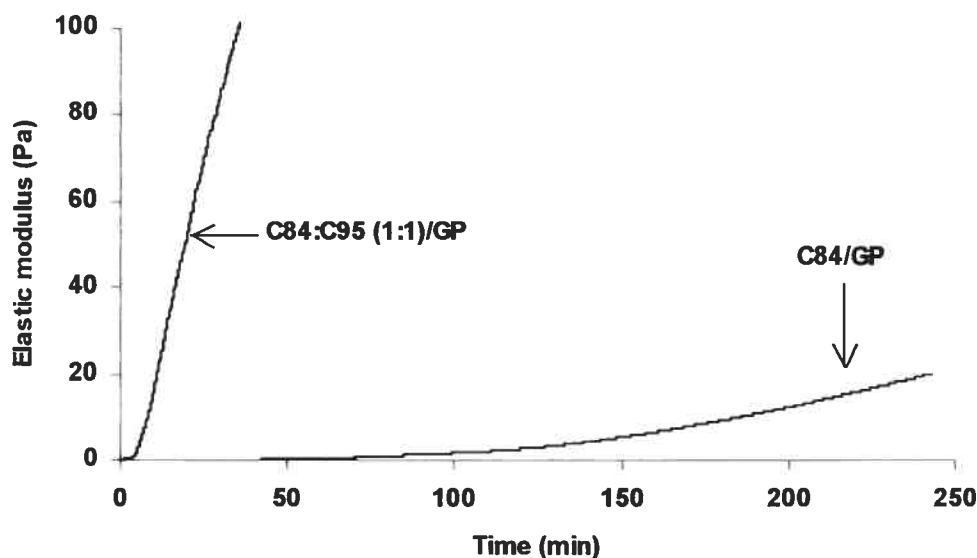


Figure 3.1 Elastic modulus as a function of time at  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  for two different C/GP solutions. The frequency of oscillation is 1 Hz and the acquisition rate is 1 point every 13 seconds.

### 3.4.2 Stability of C/GP solutions

At all times, the C84-based solution exhibited a pseudoplastic behavior *i.e.* a decrease of viscosity with increasing shear rate. Its viscosity remained unchanged for three months when the solution was kept at 4°C (Fig. 3.2a) showing that the C84-based system kept at 4°C can remain in the sol state for at least three months. At room temperature, the viscosity was stable for two months but increased at the third month (Fig. 3.2b). The appearance of a yield stress (Table 3.1) and thixotropic behavior accompanied this change.

The viscosity of the solution made of a 1:1 (w/w) mixture of C84:C95 increased more rapidly. The samples kept at 4°C were stable for 3 days but gelled within 7 days (data not shown). The samples kept at room temperature turned into gels in less than 24 h making viscosity measurements impracticable (data not shown).

Tableau 3.1 Yield stress (dynes/cm<sup>2</sup>) of a C84/GP solution as a function of time of storage at 4±0.1°C or room temperature. Each value is a mean ± SEM of three measurements.

	4°C	Room temperature
<b>1 day</b>	9.17 ± 0.25	9.11 ± 0.36
<b>7 days</b>	12.60 ± 2.70	25.77 ± 16.44
<b>30 days</b>	11.83 ± 0.42	7.63 ± 0.20
<b>60 days</b>	11.63 ± 0.67	13.23 ± 0.96
<b>90 days</b>	14.87 ± 5.23	227.60 ± 37.40

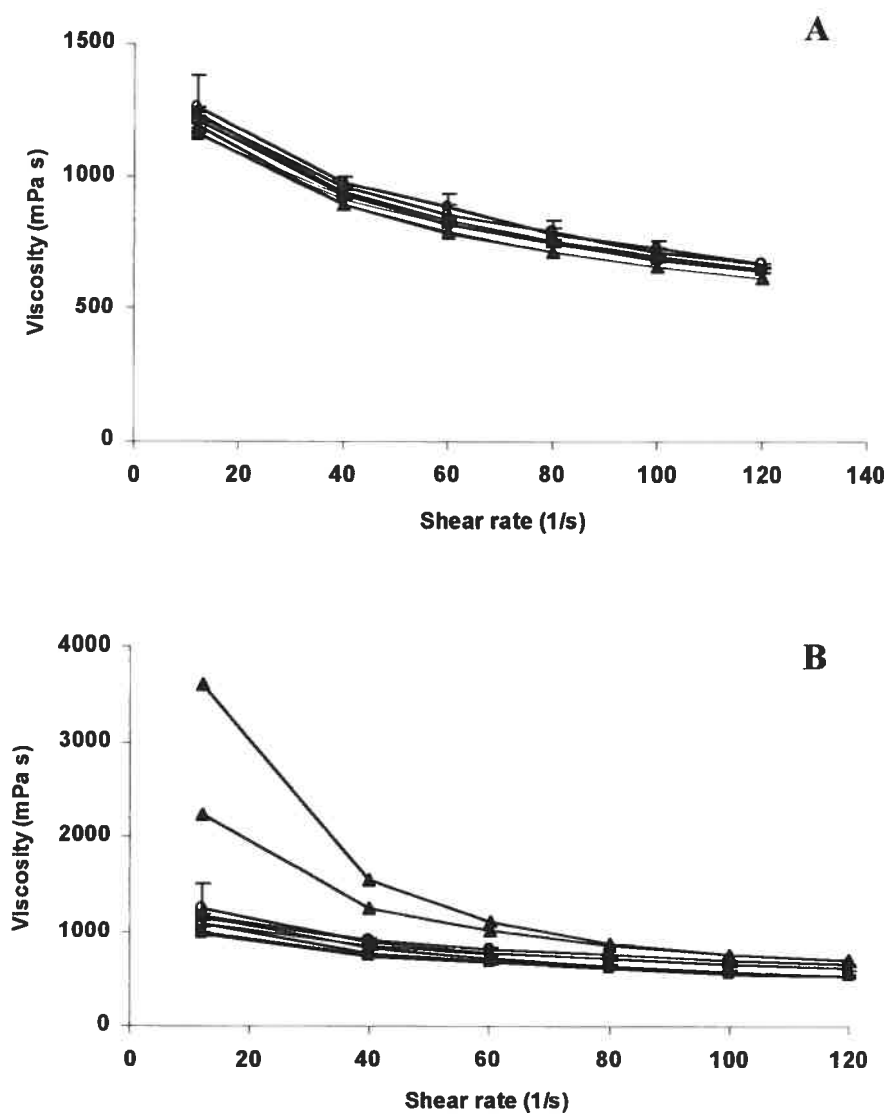


Figure 3.2 Viscosity at  $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$  as a function of shear rate for a C84/GP solution depending on the time of storage at  $4^\circ\text{C}$  (A) or room temperature (B). After 1 day (●), 7 days (○), 30 days (■), 60 days (□) and 90 days (▲). Each point represents the mean value  $\pm$  SEM from three measurements.

### 3.4.3 *In vitro* release studies

The incorporation of GP in the medium molecular weight chitosan solution substantially reduced the initial burst release of chlorpheniramine maleate (391 Da), especially during the first 6 h (Fig. 3.3). From 0 to 48 h, the release from the chitosan solution with GP was significantly slower than the release from the chitosan solution. Fifty three percent of the chlorpheniramine maleate was released from the chitosan solution within 4 h whereas only 15 % was released in the presence of GP over the same period of time. This study showed that GP enables a fast organization of the polymeric network to retain the model compound.

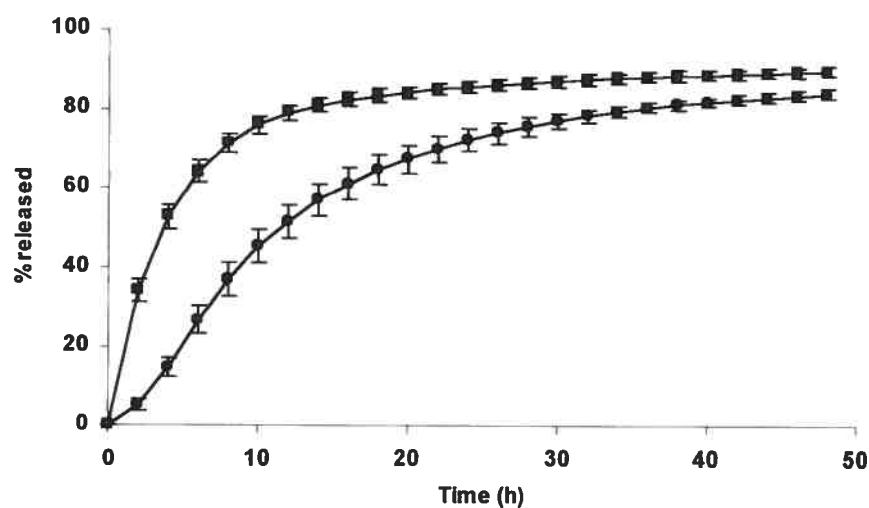


Figure 3.3 Chlorpheniramine maleate release profile from a medium molecular weight chitosan solution with (●) or without (■) GP in PBS at pH 7.4 and  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . In each experiment, the loading was 3%. Each point represents the mean value  $\pm$  SEM (n=5).



The differences between the release profiles of dextrans with increasing molecular weights from C84/GP solutions were minor but an overall trend is apparent (Fig. 3.4). As the molecular weight of the model compound increased, the release rate decreased. The release of 90 % of the model compound took 52, 60, 76, and 88 h for the dextran with a molecular weight of 12 000, 19 500, 38 260 and 148 000, respectively. The statistical analysis showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) only between the dextran with a molecular weight of 12 000 and the dextran with a molecular weight of 148 000. The gelation rate did not influence the release of dextran since the release kinetics between the C84/GP and C84:95/GP gels were similar (data not shown).

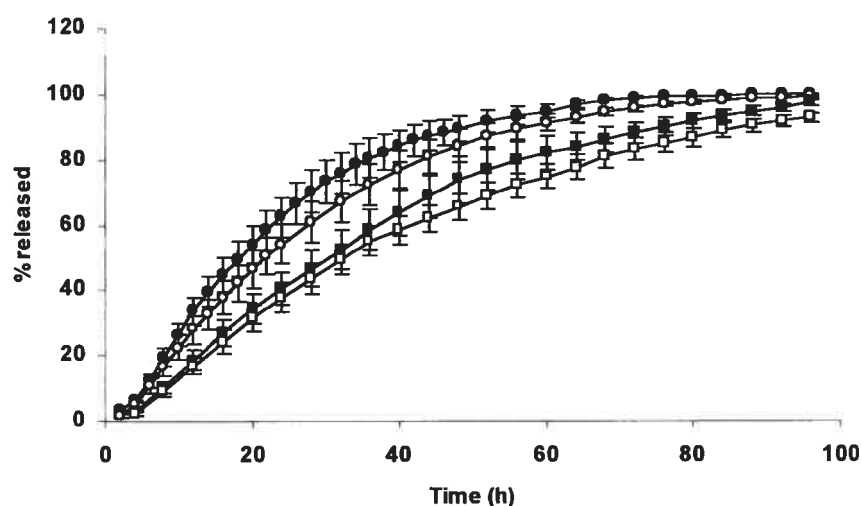


Figure 3.4 Release profiles of FITC-dextran of different molecular weights from a C84/GP solution in PBS at pH 7.4 and  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . 12 000 (●), 19 500 (○), 38 260 (■), 148 000 (□). In each experiment, the loading was 3%. Each point represents the mean value  $\pm$  SEM ( $n=5$ ).

In the C84/GP solutions, each mole of  $\text{NH}_3^+$  (chitosan) is neutralized by 2.6 moles of  $\text{PO}_4^{2-}$  (glycerophosphate). To evaluate the influence of excess negative charges on the release of model compounds, a positively charged (methylene blue) and a negatively charged (calcein) molecule were incorporated in the C84/GP solution. The release of methylene blue and calcein from the gel was completed within 48 h (Fig. 3.5). The release rate was independent of the drug electrostatic charge suggesting that the methylene blue or calcein in small concentration (0.06% and 0.18%, respectively) are not bound by ionic attractions to the polymeric network.

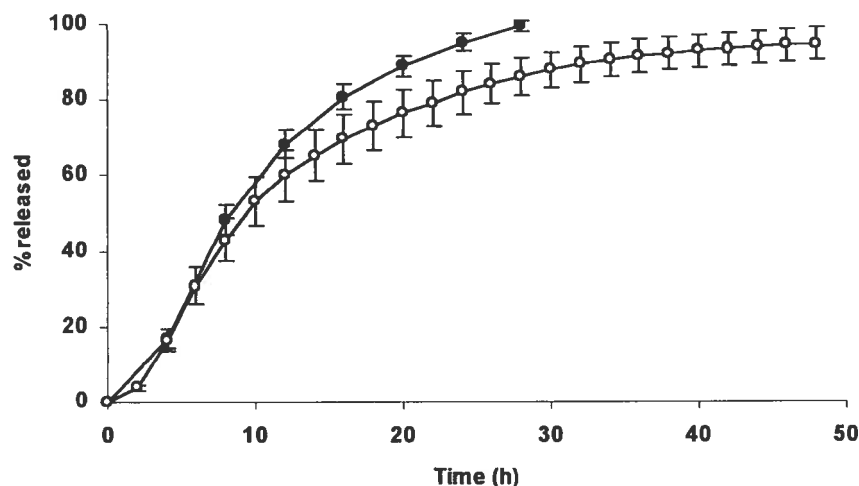


Figure 3.5 Methylene blue (●) and calcein (○) release profiles from a C84/GP solution in PBS at pH 7.4 and  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Each point represents the mean value  $\pm$  SEM ( $n=5$ ).

At a pH of about 7.0, which is the pH of the C/GP solution, albumin has a net negative charge. When albumin was mixed with the C84/GP solution at a high concentration (3%), about 50% was released in 3 days and, afterwards, a plateau was reached (Fig. 3.6). The remaining albumin was trapped in the gel. In order to release it, lysozyme was added to the release media. After addition of 0.025 mg/mL of lysozyme, another 25% of albumin were released. A subsequent increase in lysozyme concentration (0.25 mg/mL) did not significantly influence the release of albumin.

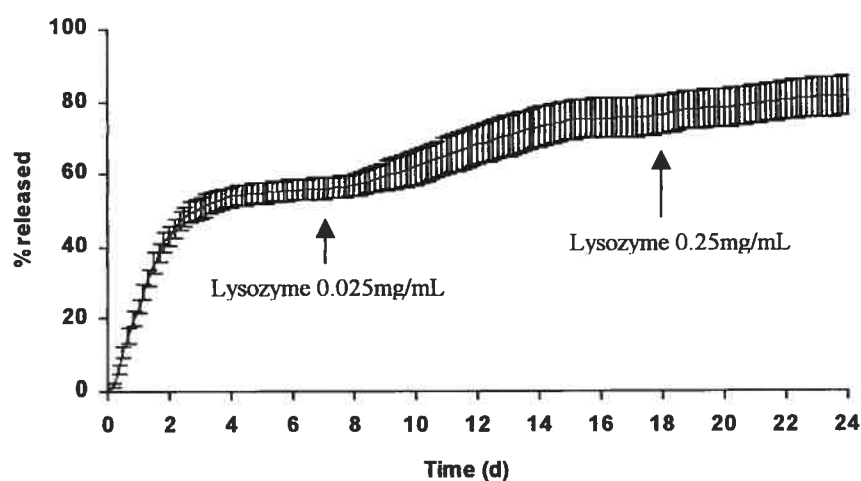


Figure 3.6 FITC-albumin release profile from a C84/GP solution in PBS  $\pm$  lysozyme at pH 7.4 and  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . Each point represents the mean value  $\pm$  SEM (n=5).

### 3.4.4 Mass loss

At the end of each release study, the gels were taken out of the cells and weighed (data not shown). Approximately 40% of the total weight and 70% of the dry weight was lost at the end of the release study. Fig. 3.7 reveals that most of the total mass is lost during the first 4 h. During the next 20 h, only 5 to 10% was lost. Even if the C84:C95/GP solution gels more rapidly the mass loss profile is similar to the one of the C84/GP solution. The dried mass lost follows the same kinetics as the total mass. The loss of solid mass during the first 4 h is high, reaching 71% of the initial solid mass.

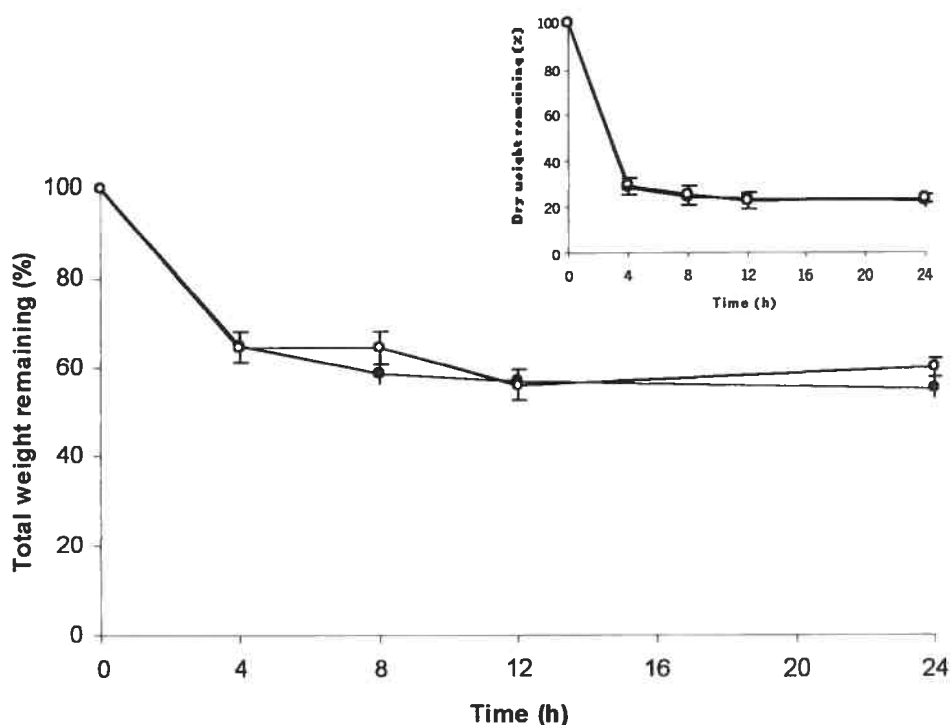


Figure 3.7 Total mass of the gelled C/GP solution as a function of time: C84/GP (●) and C84:C95/GP (○). Inset: dry weight of the gelled C/GP solution as a function of time: C84/GP (●) and C84:C95/GP (○). Each point represents the mean value  $\pm$  SEM (n=3).

### 3.4.5 Scanning electron microscopy

The micrographs revealed that the gels are porous (Fig. 3.8). After 4 h of exposure to the release medium (PBS) at  $37\pm0.1^{\circ}\text{C}$ , the C84/GP solution was solid and pores between 5 and 10  $\mu\text{m}$  were present. Large pores were expected because of the low polymeric load of the system. With time, there was no substantial increase in pore size. The gel made of C84:C95/GP had pores in the same size range.

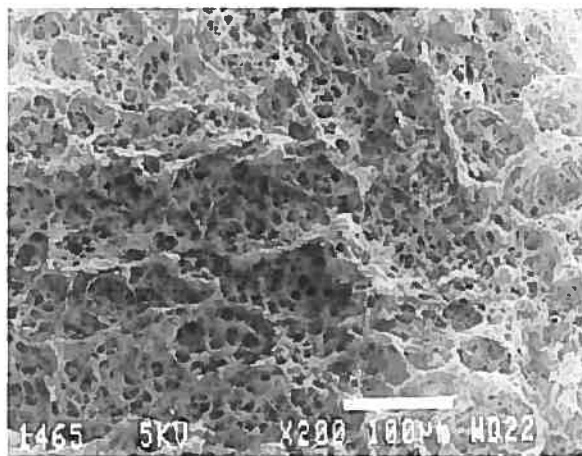


Figure 3.8 Scanning electron micrograph of a C84/GP solution after 24 h of exposition to the release medium (PBS) at  $37\pm0.1^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 Discussion

In C/GP systems, three types of interactions may be involved during the gelation process: 1) electrostatic attraction between the ammonium group of the chitosan and the phosphate group of the glycerophosphate, 2) hydrogen bonding between the chitosan chains as a consequence of reduced electrostatic repulsion after neutralization of the chitosan solution with GP and 3) chitosan-chitosan hydrophobic interactions. When kept at low temperatures C/GP solutions having a pH of about 7 might not immediately turn into a gel (Fig. 3.2a). Gelation occurs upon an increase in temperature. This observation implies that some repulsive forces between the chitosan chains are stabilized at low temperature and weakened at high temperature. We hypothesized that the polyol part of GP prevents or slows down gelation at low temperature. Polyols are known to stabilize certain compounds in aqueous solutions and to promote the formation of a shield of water around some macromolecules in polyol-water mixtures (31). Gekko et al. (32,33) showed that the addition of polyols to aqueous solutions of collagen or carrageenan raised the transition and gelation temperature, respectively, meaning that the initial structure was reinforced by polyols so more energy was needed to break it. This group also reported a negative preferential interaction parameter of glycerol to protein for 4 proteins in glycerol-water mixtures at 20°C, indicating a deficiency of glycerol in the immediate domain of the protein. This means that the proteins were preferentially hydrated; there was a shield of water around the proteins (34). Na et al. (35) obtained similar results in their study of tubulin in glycerol solution. With those results in mind, we postulated that the addition of GP to the chitosan solution promoted the protective hydration of the chitosan chains. Therefore, at low temperatures, it prevents their association to form a gel, even at a neutral pH. Raising the temperature increases the chitosan-chitosan hydrophobic interactions which are expected to play a major role in the gelation of C/GP solutions (29). Depending on the deacetylation degree of chitosan, gelation can occur at relatively low temperatures. For instance, C95/GP solutions gel after 8 to 10 hours at 4 °C (data not shown) and the gelation rate can be significantly slowed down by the addition

of C84. Nevertheless, even solutions of C84/GP start to gel after 3 months of storage at room temperature (Fig. 3.2b). This means that C/GP solutions can slowly evolve to the gel state even below 37°C. The sol-gel transition does not occur at a determined temperature but starts as soon as the polyol salt is added. This behavior is different from that of poloxamer (36) or xyloglucan (15) solutions which will change from sol to gel only when the temperature is raised above their phase transition temperature. However, we showed that gelation of C84/GP solutions can be substantially slowed down at 4°C which can ensure the system an adequate shelf-life (Fig. 3.2a). The increase in gelation rate observed with chitosans of higher deacetylation degree might be attributed to the increase in cross-link density between the phosphate groups of GP and the ammonium groups of chitosan. Another factor that can influence the sol-gel transition is the pH of the final solution. Chenite et al. (29) demonstrated that the transition temperature of a freshly prepared 91 %-deacetylated chitosan/GP solution was around 45°C at a pH value of 6.85 and was decreased to 37°C when the pH was brought up to 7.0. One should be aware that the transition temperatures measured in this study may not be true transition temperatures but rather reflect the gelation rate; gelation being faster at higher pH values.

The release studies allowed a better understanding of the gelation kinetics. Fig. 3.3 shows that the presence of GP is essential for a fast organization of the polymeric network in order to retain the model compound. In the absence of GP, the chitosan solution eventually solidified as a consequence of the diffusion of the buffer into the system but the process was too slow or the structure formed was not organized enough to avoid burst release. From Fig. 3.4, it can be seen that the release profiles of compounds having a molecular weight between 12 000 and 148 000 do not differ substantially. There was no important decrease in release rate above a certain molecular weight threshold because the pore size was considerably larger than the size of the released molecule. Despite a difference in the gelation rate, the release kinetics between the C84/GP and C84:C95/GP systems were comparable, probably because the two gels have similar porous structures as revealed by SEM (data not shown). Accordingly, C/GP solutions

could be used to deliver relatively large molecules over a period of several hours. Release in this case seems to be more sustained than that observed with other polysaccharide hydrogels such as xyloglucan and dextran gels with similar polymeric loads (15,37). However, a more prolonged release would require the pre-encapsulation of drugs into particles (microspheres, liposomes) in the micrometer size range which could then be incorporated in the gel (38). The release of the model compounds is thought to occur mostly by diffusion but could be accelerated by the weight loss of the gels. However, from Fig. 3.7 it can be seen that the release kinetics do not parallel the weight loss profiles. After 4 h, almost 70 % of the gel solid content is lost (35 % of total hydrated weight) even though more than 80 % of the initial drug load remains in the gel. This suggests that during the first hours there is a considerable leaching of excess GP (and water) which does not contribute to the physical cross-linking of the gel. The three-dimensional network of the gel did not change significantly over time, indicating that there was no substantial erosion of the polymeric matrix. However, excess GP is needed to increase the pH and thus, the gelation rate. Our results are in accordance with currently ongoing studies which revealed that most of the GP rapidly diffuses out of the gel and that the overall charge in the gel is nearly neutral (Buschmann et al. personal communication). The electroneutrality of the gel network was confirmed by the release studies with compounds bearing an electrostatic charge (Fig. 3.5). When present at low concentrations (less 0.2%), their release profiles are comparable regardless of the electrostatic charge suggesting that no free charges are available to retain the model compound. However, at high concentrations, negatively charged compounds such as albumin may displace GP and bind to chitosan via the ammonium groups. Indeed at 3% loading, the release of albumin reached a plateau after 3 days, suggesting that part of the albumin was linked to the polymeric network. The addition of lysozyme to the release media allowed partial release of the entrapped albumin but 100% recovery was not possible since the gel made of C84 was relatively resistant to the action of the enzyme. After 17 days of exposure to lysozyme, the gels had a final hydrated mass comparable to that of gels not exposed to lysozyme. However, the gels had lost their three-dimensional structure. Our results are consistent with those found in the literature. Tomihata et al. (39) reported that the *in vitro* degradation of chitosan films in 0.1M PBS containing 4 mg/mL of



lysozyme at pH 7.4 and 37°C occurred less rapidly as their deacetylation degree became higher. Chitosans with degrees of deacetylation higher than 73% were virtually resistant against enzymatic hydrolysis at this lysozyme concentration. In another paper, Hata et al. (40) reported that as the deacetylation degree of the carboxymethyl chitin increased, the change in viscosity after addition of lysozyme (0.018 mg / mL) became slower.

The results presented here showed that C/GP solutions have the potential to be used as injectable in situ gelling thermosensitive formulations. They can gel at body temperature. The C84/GP solution retains its physical properties for three months and two months when kept at 4°C and room temperature, respectively. C/GP systems can sustain the release of macromolecules over a period of several hours to a few days. Sustained release over more than one week will probably require pre-incorporation of the drug into microparticles or liposomes for those molecules that release is only a function of passive diffusion.

### **Acknowledgements**

This study was supported in part by a grant from The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

### 3.6 References

1. B. Bittner, M. Morlock, H. Koll, G. Winter, T. Kissel, Recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: influence of the encapsulation technique and polymer purity on microsphere characteristics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 295-305.
2. B.K. Davis, Diffusion in polymer gel implants, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71 (1974) 3120-3123.
3. D. Bodmer, T. Kissel, E. Traechslin, Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems, *J. Controlled Release.* 21 (1992) 129-138.
4. T.P. Johnston, S.C. Miller, Inulin disposition following intramuscular administration of an inulin/poloxamer gel matrix, *J. Parent. Sci. Technol.* 43 (1989) 279-286.
5. T.P. Johnston, M.A. Punjabi, C.J. Froelich, Sustained delivery of interleukine-2 from a poloxamer 407 gel matrix following intraperitoneal injection in mice, *Pharm. Res.* 9 (1992) 425-434.
6. E.A. Pec, Z.G. Wout, T.P. Johnston, Biological activity of urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 626-630.
7. S.D. Desai, J. Blanchard, In vitro evaluation of pluronic F127-based controlled-release ocular delivery systems for pilocarpine, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 226-230.
8. R. Bhardwaj, J. Blanchard, Controlled-release delivery system for the MSH analog melanotan-I using poloxamer 407, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 915-919.
9. W.K. Palmer, E.E. Emeson, T.P. Johnston, Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57BL/6 mouse, *Atherosclerosis.* 136 (1998) 115-123.
10. A.S. Hoffman, A. Afrassiabi, L.C. Dong, Thermally reversible hydrogels: II. Delivery and selective removal of substances from aqueous solutions, *J. Controlled Release.* 4 (1986) 213-222.

11. A.S. Hoffman, Applications of thermally reversible polymers and hydrogels in therapeutics and diagnostics, *J. Controlled Release*. 6 (1987) 297-305.
12. T. Okano, Y.H. Bae, H. Jacobs, S.W. Kim, Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release, *J. Controlled Release*. 11 (1990) 255-265.
13. R. Dinarvand, A. D'Emanuel, The use of thermoresponsive hydrogels for on-off release of molecules, *J. Controlled Release*. 36 (1995) 221-227.
14. B. Jeong, Y.H. Bae, D.S. Lee, S.W. Kim, Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, *Nature*. 388 (1997) 860-862.
15. S. Miyazaki, F. Suisha, N. Kawasaki, M. Shirakawa, K. Yamatoya, D. Attwood, Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery, *J. Controlled Release*. 56 (1998) 75-83.
16. B. Nystrom, H. Walderhaug, F.K. Hansen, Rheological behavior during thermoreversible gelation of aqueous mixtures of ethyl(hydroxyethyl)cellulose and surfactants, *Langmuir*. 11 (1995) 750-757.
17. L.J. Casarett, J. Doull, Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, Pergamon Press, New York, 1991, p.1033.
18. L. Illum, S.S. Davis, M. Pawula, A.N. Fisher, D.A. Barrett, N.F. Farraj, P.N. Shaw, Nasal administration of morphine-6-glucoronide in sheep - A pharmacokinetic study, *Biopharm. Drug. Disp.* 17 (1996) 717-724.
19. V.R. Patel, M.M. Amiji, Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach, *Pharm. Res.* 13 (1996) 588-593.
20. T. Chandy, C.P. Sharma, Chitosan - as a biomaterial, *Biomat., Art. Cells, Art. Org.* 18 (1990) 1-24.
21. K.Y. Lee, W.S. Ha, W.H. Park, Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives, *Biomaterials*. 16 (1995) 1211-1216.
22. A. Miwa, A. Ishibe, M. Nakano, T. Yamahira, S. Itai, S. Jinno, H. Kawahara, Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1844-1850.

23. O. Felt, P. Furrer, J.M. Mayer, B. Plazonnet, P. Buri, R. Gurny, Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention, *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 185-193.
24. S. Aiba, Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans, *Int. J. Biol. Macromol.* 14 (1992) 225-228.
25. S. Hirano, H. Tsuchida, N. Nagao, N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis, *Biomaterials.* 10 (1989) 574-576.
26. Y. Machida, T. Nagai, M. Abe, T. Sannan, Use of chitosan and hydroxypropylchitosan in drug formulations to effect sustained release, *Drug Design Deliv.* 1 (1986) 119-130.
27. K.M. Varum, M.M. Myrh, R.J.N. Hjerde, O. Smidsrod, In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum, *Carbohydrate Res.* 299 (1996) 99-101.
28. E.J. Singer, E.P. Pittz, Interaction of surfactants with epidermal tissues: Biochemical and toxicological aspects, in: *Surfactants in cosmetics*, Marcel Dekker, New York, 1985, pp. 133-194.
29. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials.* 21 (2000) 2155-2161.
30. A. Merkli, J. Heller, C. Tabatabay, R. Gurny, Semi-solid hydrophobic bioerodible poly(ortho ester) for potential application in glaucoma filtering surgery, *J. Controlled Release.* 29 (1994) 105-112.
31. J.F. Back, D. Oakenfull, M.B. Smith, Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Biochemistry.* 18 (1979) 5191-5196.
32. K. Gekko, S. Koga, Increased thermal stability of collagen in the presence of sugars and polyols, *J. Biochem.* 94 (1983) 199-205.
33. K. Gekko, H. Mugishima, S. Koga, Effects of sugars and polyols on the sol-gel transition of k-carrageenan: calorimetric study, *Int. J. Biol. Macromol.* 9 (1987) 146-152.
34. K. Gekko, S.N. Timasheff, Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures, *Biochemistry.* 20 (1981) 4667-4676.

35. G.C. Na, S.N. Timasheff, Interaction of calf brain tubulin with glycerol, *J. Mol. Biol.* 151 (1981) 165-178.
36. V. Lenaerts, C. Triqueneaux, M. Quarton, F. Rieg-Falson, P. Couvreur, Temperature-dependent rheological behavior of pluronic F-127 aqueous solutions, *Int. J. Pharm.* 39 (1987) 121-127.
37. W.E. Hennink, H. Talsma, J.C.H. Borchert, S.C. De Smedt, J. Demeester, Controlled release of proteins from dextran hydrogels, *J. Controlled Release*. 39 (1996) 47-55.
38. A. Bochot, E. Fattal, A. Gulik, G. Couarraze, P. Couvreur, Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1364-1369.
39. K. Tomihata, Y. Ikada, In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials*. 18 (1997) 567-575.
40. H. Hata, H. Onishi, Y. Machida, Evaluation of carboxymethyl chitin as a drug carrier. Effect of the deacetylation degree on the biodegradation and biodisposition characteristics in mice, *S.T.P. Pharma Sci.* 9 (1999) 115-121.

## **CHAPITRE 4**

### **THERMOSENSITIVE CHITOSAN-BASED HYDROGEL CONTAINING LIPOSOMES FOR THE DELIVERY OF HYDROPHILIC MOLECULES**

#### **4 Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules**

E. Ruel-Gariépy<sup>ab</sup>, G. Leclair<sup>b</sup>, P. Hildgen<sup>b</sup>, A. Gupta<sup>c</sup>, and J.C. Leroux<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Canada Research Chair in Drug Delivery, <sup>b</sup>Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>c</sup>BioSyntech Inc., 475 Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada, H7V 4B3

\*Corresponding author. Tel.: +1-514-343-6455, Fax: +1-514-343-7738

Reprinted from Journal of Controlled Release 82 (2002) 373-383 with permission from Elsevier.

## 4.1 Abstract

A novel injectable *in situ* gelling thermosensitive chitosan/ $\beta$ -glycerophosphate (C/GP) formulation has been recently proposed for tissue repair and drug delivery. The system can sustain the release of macromolecules over a period of several hours to a few days. However, with low molecular weight hydrophilic compounds, the release is generally completed within 24 hours. In this study, liposomes were added to the C/GP solution and their effect on the viscoelastic properties of the system and release kinetics of encapsulated carboxyfluorescein was investigated. The gelation rate and gel strength were slightly increased by the presence of the liposomes. The *in vitro* release profiles demonstrated controlled delivery over at least 2 weeks. The release rate strongly depended on the liposome size and composition (*i.e.* addition of cholesterol), and

on the presence of phospholipase in the release medium. The kinetics was not substantially modified when using liposomes prepared with a negatively-charged lipid or a lipid having a high phase transition temperature. These results indicate that the liposome-C/GP system rapidly gels at body temperature, and can sustain the delivery of low molecular weight hydrophilic compounds. A mathematical model was proposed to characterize the release kinetics.

**Keywords:** chitosan, thermosensitivity, hydrogel, sustained delivery, liposomes

## 4.2 Introduction

In the past few years, an increasing number of *in situ* forming formulations have been reported in the literature for various biomedical applications (1), particularly in drug delivery (2-5). *In situ* “implant” formation can occur as a result of either a physical or chemical change of the system. Hill-West et al. (1) used photopolymerization to coat the inner surface of injured arteries in order to inhibit thrombosis and intimal thickening. Capello et al. (2) reported peptide-based self-assembling gels consisting of block copolymers that contain repeating amino acid sequences from silk and elastin proteins. Dunn et al. (6) proposed an *in situ* forming system comprised of a water-insoluble polymer dissolved in a water-miscible biocompatible solvent. Upon contact with body fluids, the solvent diffuses out of the polymer while water permeates into the liquid polymer matrix. Due to the polymer insolubility in water, the polymer precipitates, resulting in the formation of a solid polymeric implant. This system was also evaluated by Shively et al. (7) and Eliaz and Kost (8) using different poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) copolymers in various solvents. Haglund et al. (9) investigated a similar system consisting of an insoluble polymer complex of poly(methacrylic acid) and poly(ethylene glycol) (PEG) dissolved in a hydroalcoholic solvent containing ethanol.



All these *in situ* forming systems present specific drawbacks that need to be carefully taken into account when considering biomedical applications. The photopolymerization process requires the presence of a photoinitiator at the site of gelation and the use of an argon ion laser. Regarding peptide-based gels, the polymer has to be carefully chosen and the preparation method for administration well defined because some polymers turn into gels at room temperature in less than 3 hours (2). With the precipitation method, incomplete implant formation can be observed *in vivo*; this can result in a high initial release and cause local or systemic toxicity. Moreover, the organic solvent used to solubilize the polymer can physically denature labile compounds such as proteins. In order to obtain *in situ* forming formulations that do not require organic solvents or copolymerization agents, research oriented toward thermosensitive polymers has gained increasing attention. The most studied thermosensitive polymers are poloxamers and copolymers of *N*-isopropylacrylamide (10-14). However, these polymers are of limited use for parenteral administration, mainly because they are not biodegradable. Recently, Jeong et al. (15) developed PEG and poly(lactic acid) block copolymer systems that are in the sol state at temperatures around 45°C and gel upon cooling to body temperature. Even though these copolymers are biocompatible and biodegradable, the need to heat the solution to incorporate the drug and inject the system makes this approach less practical. They also later reported aqueous solutions of PEG and poly(lactic-co-glycolic acid) block copolymers that undergo sol-gel transition with an increase in temperature. The subcutaneously injected sol formed a gel *in vivo* within a few seconds and the gel maintained its physical integrity for more than 1 month (16-20).

We recently demonstrated that chitosan solutions neutralized with a polyol counterionic dibase salt such as  $\beta$ -glycerophosphate (GP) are thermosensitive. These solutions remain liquid for long periods of time at room temperature and turn into gels as temperature increases (21-23). We also investigated the physical properties of these thermosensitive solutions and established the *in vitro* release profile of several model compounds. It was found that such systems can gel at body temperature, retain their physical properties for

at least two months depending on the storage conditions, and sustain the release of macromolecules over a period of several hours to a few days. However, with low molecular weight hydrophilic compounds ( $<1000$  g/mol), more than 80% of the incorporated drug was released during the first 24 h. The relatively fast release was attributed to the high water content of the hydrogel ( $>90\%$ ) and, thus, to the presence of very large pores. In order to obtain a sustained release, which would be independent of the drug's molecular weight, it was decided to load the selected compound into liposomes and then incorporate the latter in the thermosensitive solution. As previously demonstrated by other groups (24-26), the physical barrier provided by the lipid bilayer and the slower diffusion of the liposomes in the hydrogel can significantly decrease the release rate. As opposed to amphiphilic thermogelling formulations (*e.g.* poloxamers), the risk of liposomal destabilization by the polymer is minimal since chitosan is substantially devoid of any surface-active properties, and thus should be compatible with most liposomal formulations. The aim of this study was to characterize the viscoelastic behavior of the liposome-hydrogel formulations and the *in vitro* release kinetics of a small molecular weight polar model compound encapsulated in the liposomes.

## 4.3 Materials and methods

### 4.3.1 Materials

Egg phosphatidylcholine (EPC), cholesterol (Chol), 1,2-dimyristol-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC) were purchased from Northern Lipids (Vancouver, BC, Canada). Chitosan hydrochloride (Protasan<sup>®</sup> UP CL214,  $M_w$  455 200, 95% deacetylated) was obtained from Pronova Biopolymer A.S. (Oslo, Norway). GP and phospholipase A<sub>2</sub> from bee venom were from Sigma (St. Louis, MO). 5-(and-6)-carboxyfluorescein (CF) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). All other chemicals were reagent grade. All products were used as received. Deionized distilled water from a Milli-Q water system of Millipore (Fisher Scientific Limited, Nepean, On) was used to prepare the aqueous solutions.

### 4.3.2 Preparation of the liposomes

Large unilamellar liposomes (30 mM lipids) were prepared according to the reverse-phase evaporation method (27,28). Briefly, lipids in chloroform or chloroform:methanol (2:1 *v/v*) were deposited on the sides of a tube by evaporation of the organic solvent. The lipid film was redissolved in diethyl ether and the aqueous phase (pH 7.4, 300 mOsm/kg) containing 20 mM Hepes and 144 mM NaCl or 100 mM CF was added. The mixture was sonicated to obtain a homogeneous w/o emulsion, and then the organic solvent was removed under vacuum. The preparations were extruded to obtain the required liposome size, and free CF was removed by size exclusion chromatography (SEC) using a Sephadex G-50 column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Multilamellar liposomes were prepared by the hydration method (29) and were not subjected to extrusion. Free CF was removed as described above. For all

liposome formulations, the entrapment efficiency ranged between 1 and 8 %. The selection of CF as a model compound was based on its ability to self-quench at concentrations above 10 mM (30). Thus, self-quenching allows material remaining in liposomes to be distinguished from that released into the medium. The amount of CF incorporated into the liposomes was determined by spectrofluorimetry on a Aminco-Bowman Series 2 fluorimeter (Spectronics Instrument Inc., Rochester, NY) ( $\lambda_{\text{exc}} = 492 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$ ). Liposome size was determined by dynamic light scattering (N4 Plus, Coulter Electronics, Miami, FL).

#### **4.3.3 Preparation of the chitosan/glycerophosphate (C/GP) solution**

Chitosan and GP solutions were prepared in deionized water and chilled in an ice bath for 15 min. The GP solution was added to the chitosan solution under stirring and the resulting mixture was stirred for another 10 min. The GP concentration was adjusted to obtain a solution iso-osmotic to the liposomal contents ( $\sim 300 \text{ mOsm/kg}$ ). The final preparations contained 1.8 % (w/w) chitosan and 3.6 % (w/w) GP.

#### **4.3.4 Rheological measurements**

The rheology study was carried out on a Bohlin CVO rheometer (Bohlin Instruments, Cranbury, NJ) equipped with a coaxial-cylinder C-14 geometry in oscillatory mode immediately after preparation of the C/GP solution with or without liposomes. The variation in storage modulus was recorded as a function of time at  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . The frequency was set at 1.0 Hz during the measurements. The acquisition rate was set at one point per 13 seconds.

### 4.3.5 Freeze-fracture electron microscopy

The sample was quenched using a sandwich technique and liquid nitrogen-cooled propane. Using this technique, a cooling rate of 10 000 Kelvin per second is reached, avoiding ice crystal formation and artifacts possibly caused by the cryofixation process. The fracturing process was carried out in a JEOL JED-9000 freeze-etching equipment and the exposed fracture plane were shadowed with Pt for 30 sec in an angle of 25-35° and with carbon for 35 sec (2 kV/ 60-70 mA,  $1 \times 10^{-5}$  Torr). The replicas produced this way were cleaned with concentrated, fuming HNO<sub>3</sub> for 24 up to 36 h followed by repeating agitation with fresh chloroform/methanol (1:1 v/v) at least 5 times. The carefully cleaned replicas were examined on a JEOL 100 CX electron microscope (JEOL USA, Peabody, MA).

### 4.3.6 *In vitro* release studies

A 400- $\mu$ L volume of free CF solution or liposomal-CF suspension was mixed with 3 g of C/GP solution at room temperature. Samples of 300 mg were placed into continuous flow (10 mL/h) thermostated cells (31) and the release was monitored by spectrofluorimetry in phosphate buffered saline (75 mM NaCl, 53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) at  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . The area of the gel exposed was 0.8 mm<sup>2</sup>. In the collected fractions, CF fluorescence was measured in the absence (free dye) and presence (free + encapsulated dye) of Triton X-100 (0.5% w/v final concentration). After 14 days, Triton X-100 was added to the release medium (0.5 % w/v) to solubilize the liposomes still entrapped in the gel and release the remaining CF. For the experiment carried out in the presence of phospholipase A<sub>2</sub>, PBS was substituted for Tris buffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4) containing 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> because the enzyme activity is calcium-dependent.

### 4.3.7 Mathematical modeling

A computer model was proposed to characterize the CF release from liposomes encapsulated in the C/GP thermosensitive solution, and to generate simulated release profiles. The computer program was developed in C++ on a dual-Celeron 400 MHz Linux server (Red Hat 6.2) with standard GNU libraries, compiler and linker. This program was based on the kinetic model shown in Fig. 4.1.

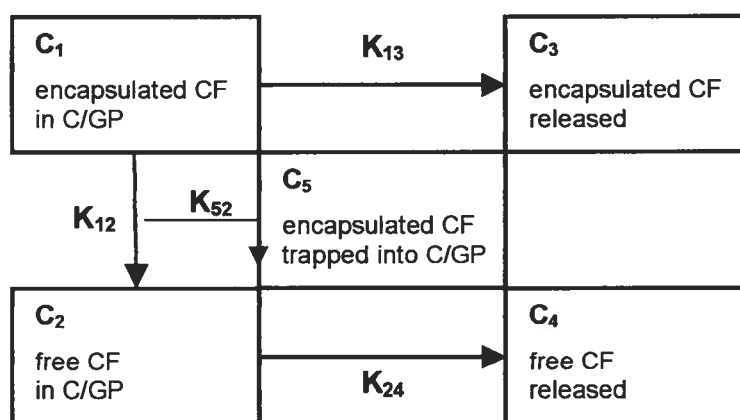


Figure 4.1 Kinetic model for the liposome-C/GP system.

In this model, 5 different states were hypothesized: CF encapsulated in liposomes suspended in the C/GP gel (C<sub>1</sub>), free CF in the C/GP gel (C<sub>2</sub>), encapsulated CF in the release medium (C<sub>3</sub>), free CF in the release medium (C<sub>4</sub>) and encapsulated CF in liposomes “permanently” trapped in the C/GP gel (C<sub>5</sub>). Transfer relations between each compartment were then defined. Four transfer relations were necessary to define this system: C<sub>1</sub> to C<sub>2</sub> (K<sub>12</sub>), C<sub>1</sub> to C<sub>3</sub> (K<sub>13</sub>), C<sub>2</sub> to C<sub>4</sub> (K<sub>24</sub>) and C<sub>5</sub> to C<sub>2</sub> (K<sub>52</sub>). K<sub>52</sub> was assumed to be equal to K<sub>12</sub>. Each transfer relation was given a microconstant (Eq. 4.1) (32):

$$dQ / dt = K Q$$

Eq. 4.1

where  $dQ/dt$  is the CF transfer rate,  $K$  is a microconstant and  $Q$  is the amount of CF in the initial compartment. This equation was solved iteratively using a  $dt$  time step of 0.1 h and the sum of all CF quantities in the system was defined to be 100%.  $K_{24}$  could be found using experimental data for the release of CF from the C/GP gel. Thereafter, the Nelder-Mead algorithm (33,34) was used against *in vitro* data to find the optimal values for  $K_{12}$ ,  $K_{52}$  and  $K_{13}$  microconstants, and the initial quantities in  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_5$  for each studied system. Initially, the sum of  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_5$  is 100%, leaving a 4 dimension Nelder-Mead problem to solve.

## 4.4 Results

### 4.4.1 Rheological measurements

Fig. 4.2 shows the rheological behavior of a C/GP solution containing different concentrations of EPC/Chol liposomes at 37°C. The increase in storage modulus over time clearly indicates that the liquid solution is turning into a solid-like gel. The addition of liposomes to the thermosensitive solution did not change the overall gelling behavior of the thermosensitive system, but as the liposome concentration increased from 0 to 15  $\mu\text{mol/mL}$ , the gelation lag time decreased from 8 to 5 min, and the storage modulus increased from 87 to 138 Pa at  $t = 60$  min. However, above 15  $\mu\text{mol/mL}$  any further increase in the lipid concentration resulted in a decrease in the gel strength (data not shown). Measurements using DSPC/Chol liposomes at 10  $\mu\text{mol/mL}$  gave similar results (data not shown). In contrast, the presence of EPC/Chol/DMPG liposomes at 10  $\mu\text{mol/mL}$  in the C/GP solution resulted in a slight decrease of the storage modulus at  $t = 60$  min compared to the C/GP solution without liposomes (data not shown).



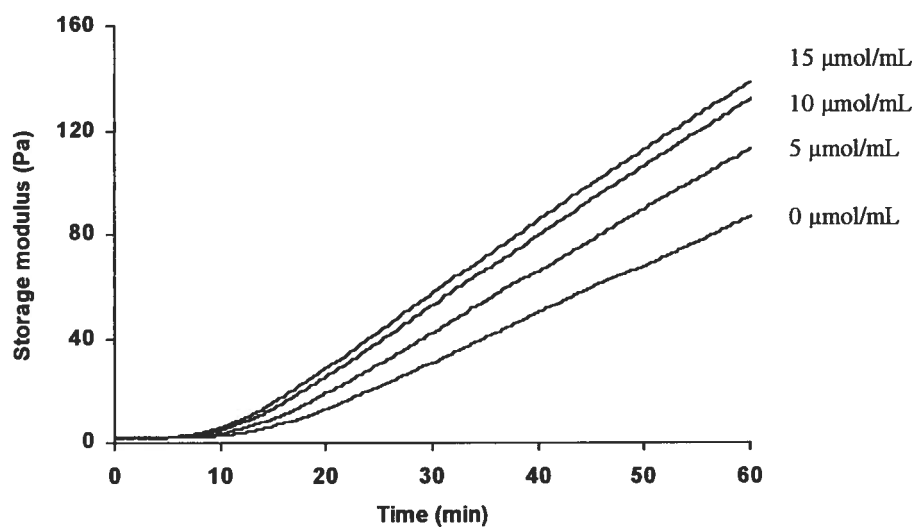


Figure 4.2 Storage modulus as a function of time at  $37\pm0.1^\circ\text{C}$  of C/GP solutions containing different concentrations of EPC/Chol liposomes. The frequency of oscillation is 1 Hz and the acquisition rate is 1 point every 13 seconds.

#### 4.4.2 *In vitro* release studies

The characteristics of the liposomes used in the release studies are reported in Table 4.1. All liposomal formulations contained a significant proportion of unencapsulated dye that was not removed by SEC.

Tableau 4.1 Characteristics of the liposomes used in the release studies and values for the simulations best fitting the experimental release data.

Entry	Composition	Mean size (nm)	Unencapsulated CF remaining after SEC (%)	C <sub>1</sub> (%)	C <sub>2</sub> (%)	C <sub>5</sub> (%)	K <sub>12</sub> , K <sub>52</sub> (10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )	K <sub>13</sub> (10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )
1	EPC	108	15	14.6	41.7	43.6	6.97	21.5
2	EPC/Chol (3:2 mol/mol)	103	13	46.2	9.1	44.7	1.56	13.7
3	EPC/Chol (3:2 mol/mol)	281	9	12.0	10.2	77.9	0.13	13.8
4	EPC/Chol (3:2 mol/mol)	589	6	2.6	1.9	95.5	0.08	21.1
5	EPC/Chol/ DMPG (10:5:1 mol/mol)	114	12	55.6	11.9	32.5	0.94	11.7
6	DSPC/Chol (3:2 mol/mol)	111	5	56.9	5.3	37.9	0.51	9.8

Fig. 4.3 clearly shows that encapsulating first CF into liposomes substantially slowed down its release from the hydrogel. Indeed, when CF was simply mixed with the C/GP solution, the release was completed within 24 h. Conversely, the gels containing 100 or 280 nm EPC/Chol liposomes released only 72 and 26 % CF after 2 weeks, respectively. The two liposomal formulations presented an initial burst release (13 – 27 % < 24 h), which could be attributed in part to the untrapped dye that was not completely eliminated by SEC and to some liposome destabilization (see discussion). The burst release induced by the addition of Triton X-100 at  $t = 14$  days and the freeze-fracture electron micrographs (Fig. 4.4), clearly indicated that intact liposomes were still present in the gel at the end of the *in vitro* release assay. The size of the liposomes influenced substantially the release profile (Fig. 4.3). An approximately 3-fold increase in the liposomal mean diameter (100 vs 280 nm) resulted in a 2-fold decrease of the initial burst (27 vs 13%) and a lower release rate after the first 24 h. During the first week, the release rates were approximately 6 and 2%/day for 100 and 280 nm liposomes, respectively. Thereafter, the release rates became similar for both formulations.

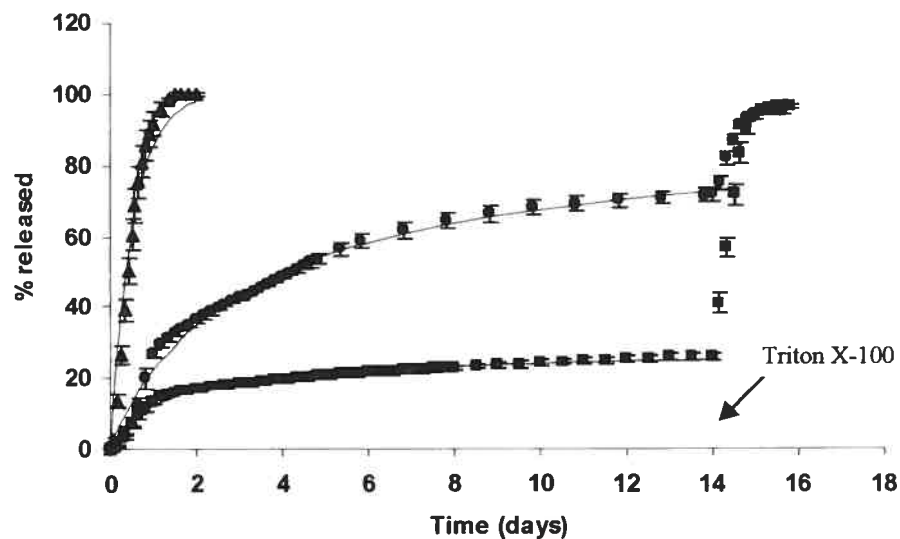


Figure 4.3 *In vitro* cumulative release of CF, free (triangles) or encapsulated in 100-nm (circles) or 280-nm (squares) EPC/Chol liposomes from the C/GP gel in PBS at 37°C. Each point represents the mean value  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). The solid lines represent the simulated release kinetics.

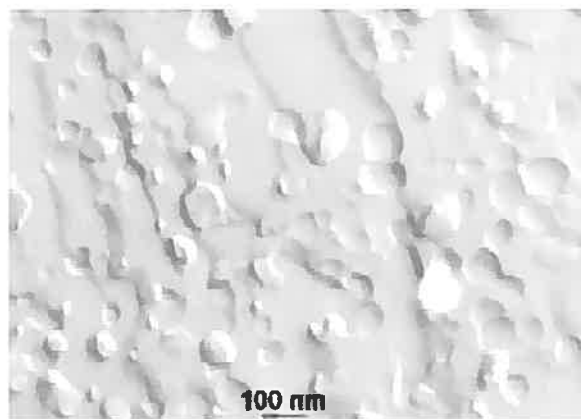


Figure 4.4 Freeze fracture electron photomicrograph of 100-nm EPC/Chol liposomes in the C/GP gel.

The use of larger (589 nm) and polydispersed liposomes prepared by the hydration method nearly abolished the release of CF (Fig. 4.5). Thus, after 8 days, phospholipase A<sub>2</sub> was added to the medium to degrade the liposomal bilayer and trigger the release of entrapped CF. Phospholipases A<sub>2</sub> are calcium-dependent enzymes that hydrolyse the *sn*-2 ester of glycerophospholipids to generate a free fatty acid and a lysophospholipid (35,36). The enzyme accelerated the release rate of CF to 5-9 %/day.

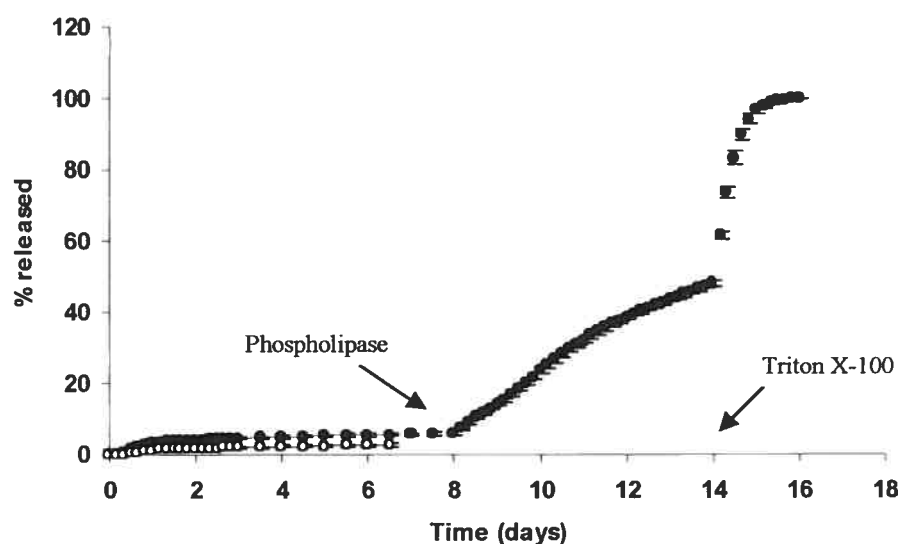


Figure 4.5 *In vitro* cumulative release of CF encapsulated in multilamellar 590-nm EPC/Chol liposomes, from the C/GP gel in PBS (days 0-7) and Tris buffer (days 8-14) containing phospholipase A<sub>2</sub> at 37°C. The total amount (closed circles) and the liposome-associated fraction (open circles) of CF released are shown in the figure. Each point represents the mean value  $\pm$  SEM (n=5). The solid lines represent the simulated release kinetics.

Fig. 4.6 illustrates the effect of incorporating 40 mol% Chol to EPC liposomes on the release kinetics. For both formulations (with and without Chol), the total (free + encapsulated) and liposomal (encapsulated only) CF released is shown in the figure. The addition of Chol to EPC liposomes decreased the initial burst release from 47 to 27 %. Despite the fact that, after the initial burst, the total release rates were similar for the two formulations, EPC/Chol liposomes retained CF more efficiently than EPC liposomes. Indeed, after 24 h, 60-70% of CF released from the EPC/Chol liposome system was still encapsulated, whereas for EPC liposomes, the encapsulated dye represented only 6-16% of the total amount of CF released.

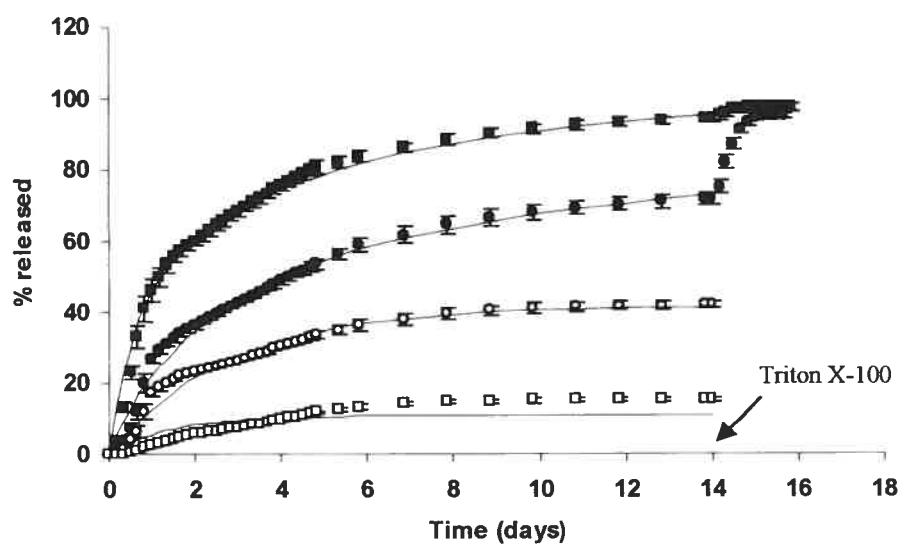


Figure 4.6 *In vitro* release kinetics of CF, encapsulated in EPC (squares) or EPC/Chol (circles) 100 nm liposomes from the C/GP gel in PBS at 37°C. The total amount (closed symbols) and the liposome-associated fraction (open symbols) of CF released are shown in the figure. Each point represents the mean value  $\pm$  SEM (n=5). The solid lines represent the simulated release kinetics.

The addition of a small proportion (6 mol%) of a negatively-charged lipid (DMPG) influenced marginally the release profile (Fig. 4.7). The initial burst and release rate were comparable to the EPC/Chol liposomal formulation, but the fraction of dye still associated to the liposomes was found to be higher.

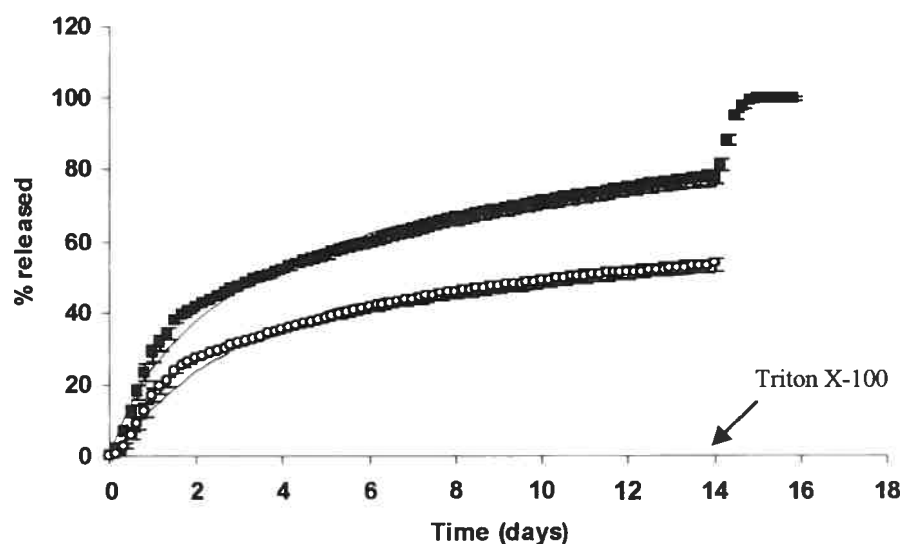


Figure 4.7 *In vitro* release kinetics of CF, encapsulated in 100-nm EPC/Chol/DMPG liposomes, from the C/GP gel in PBS at 37°C. The total amount (closed circles) and the liposome-associated fraction (open circles) of CF released are shown in the figure. Each point represents the mean value  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). The solid lines represent the simulated release kinetics.

Also, as shown in Fig. 4.8, the use of a lipid with a high phase transition temperature (DSPC,  $T_m = 55^\circ\text{C}$ ) further stabilized the formulation although the effect was modest. During the first week, the total release rate of CF from the EPC/Chol liposome gel system was slightly higher than that obtained with the DSPC/Chol formulation (6 vs 5%/day). Drug leakage from the liposomes decreased in the presence of DSPC since 70 to 80% of the drug released after 24 h remained encapsulated, compared to 60% with the EPC/Chol formulation.

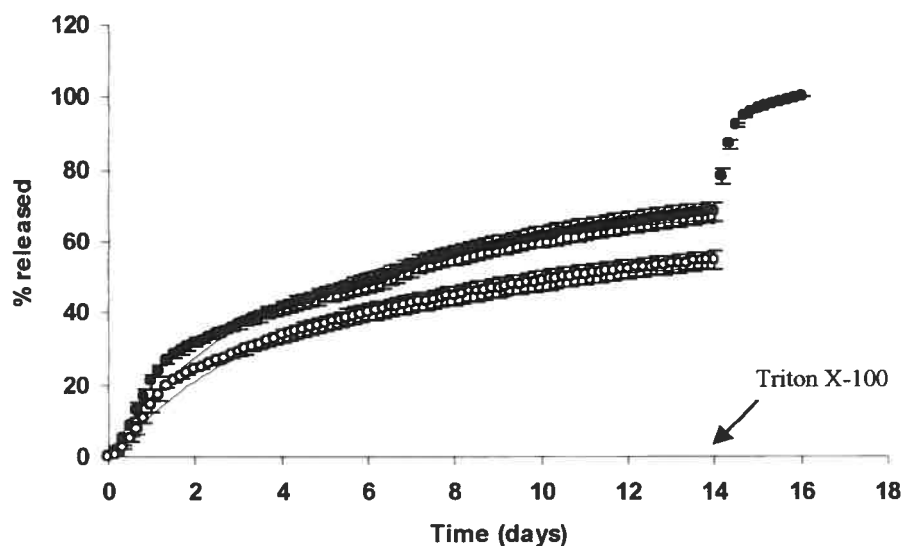


Figure 4.8 *In vitro* release kinetics of CF, encapsulated in 100-nm DSPC/Chol liposomes, from the C/GP gel in PBS at  $37^\circ\text{C}$ . The total amount (closed circles) and the liposome-associated fraction (open circles) of CF released are shown in the figure. Each point represents the mean value  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). The solid lines represent the simulated release kinetics.



Results of the computer modeling for the release of CF from liposomes encapsulated in the C/GP hydrogel are reported in Table 4.1. The transfer constant  $K_{24}$  ( $79.7 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) which corresponds to the release of free CF from the hydrogel, was calculated using the experimental data provided in Fig. 4.3 (solid triangles). This constant was introduced in the computer simulations to calculate the other transfer constants. The transfer constant between compartments 3 and 4 (Fig. 4.1) was not used in the model since this transfer was considered negligible during the time period of a few hours required to carry out the fluorescence readings.

The initial quantities in  $C_1$ ,  $C_2$  and  $C_5$  and the values of each transfer constant best fitting the experimental release are shown in Table 4.1, whereas the simulated release kinetics are presented in Fig. 4.3 and 4.5-8 (solid lines). The simulated releases fitted reasonably well with the experimental data. The release of encapsulated CF from the EPC liposome-gel was slightly underestimated (Fig. 4.6, open squares). This is however not surprising since, in this case, most of the CF released from the hydrogel is not associated to the liposomes.

The initial free CF quantity in C/GP ( $C_2$ ) gel was responsible for the burst release in each system. The  $C_2$  value corresponds to the sum of the unencapsulated CF (Table 4.1) and CF released following the introduction of the liposomes in the C/GP solution (i.e. initial destabilization). In general, the  $C_2$  value was roughly equal to the proportion of unencapsulated CF (Table 4.1) except for the EPC liposome-system (entry 1), which demonstrated an important amount of initial leakage ( $C_2 = 41.7 \%$ ). The proportion of encapsulated CF “permanently” trapped in the C/GP gel ( $C_5$ ) was mostly dependent on liposome size. The 100-nm liposomes (entries 1, 2, 5 and 6) presented similar  $C_5$  values, and as liposome size increased (entries 3 and 4),  $C_5$  increased. The highest  $K_{12}$ ,  $K_{52}$  value ( $6.97 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) was obtained with the EPC liposome-gel (entry 1), reflecting the higher permeability and/or lower stability of these liposomes. Conversely, the multilamellar EPC/Chol liposome gel (entry 4) presented a low

$K_{12}$ ,  $K_{52}$  value ( $0.08 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). Surprisingly, a high  $K_{13}$  value was found for entry 4. These liposomes were characterized by a very broad size distribution. The  $K_{13}$  constant characterizes the release of liposomal CF, and one would anticipate this constant to be inversely related to the liposome size. These results suggest that, for a given liposome population, only the smallest vesicles will be released from the hydrogel, whereas large liposomes will remain trapped in the matrix and thus, will not contribute to  $K_{13}$ . In the case of entry 4, the fraction of CF which is released encapsulated represents only 2.6% of the total CF.

## 4.5 Discussion

Over the past few years, gel matrices containing liposomes have been proposed in the literature as novel drug delivery systems (24-26). The mixture of liposomes and gel has proved useful to decrease the release rate of different compounds, compared to their incorporation in liposomes or gels only. The rationale behind these formulations is to maintain the liposomes at the delivery site and to avoid rapid clearance from the system in order to obtain a sustained release delivery. In a previous study (23), we showed that the release of small molecular weight hydrophilic compounds from a C/GP thermosensitive solution was completed within 24 h. Since a more sustained delivery could not be achieved by simply increasing the polymer concentration or changing the chitosan nature (data not published), it was decided to first load the selected compound into a colloidal carrier (*i.e.* liposomes) and then incorporate the latter in the C/GP solution. First, the influence of the addition of liposomes on the gelling behavior of the thermosensitive solution at 37°C was investigated. Ideally, the presence of liposomes should not hinder the gelation process and structure of the gel. As shown in Fig. 4.2, the addition of liposomes to the C/GP solution decreased the sol-gel lag time and increased the gel strength.

In C/GP systems, 3 types of interactions may be involved during the gelation process: (1) electrostatic attraction between the ammonium group of the chitosan and the phosphate group of GP; (2) hydrogen bonding between the chitosan chains as a consequence of reduced electrostatic repulsion after neutralization of the chitosan solution with GP; and (3) chitosan-chitosan hydrophobic interactions (23). A detailed description of the potential mechanisms of gelation has been reported by Chenite et al. (22). Chitosan has a strong potential for chemical interactions toward anionic and hydrophobic material, since it acts simultaneously as a polycationic molecule and a participant in hydrophobic interactions owing to its remaining acetyl groups. Other groups have reported that EPC liposomes present a small negative zeta potential (-1 to -3 mV) and that incorporation of Chol up to 50 mol% in the bilayer produces no detectable change in surface charge density (37,38). Thus, since EPC/Chol liposomes are roughly neutral, electrostatic interactions between chitosan and liposomes should be of minor importance. However, hydrophobic interactions are expected to occur between chitosan and liposomes. Onsoyen (39) studied the stability characteristics of chitosan coatings on phosphatidylcholine liposomes and reported that the interactions were stronger with the low deacetylated (41%) than with the highly deacetylated (86%) chitosans, supporting the hypothesis that the interactions were mainly hydrophobic. In the liposome-C/GP system, the presence of hydrophobic interactions between the liposomes and chitosan possibly promoted bridging, and thus decreased the energy barrier required to initiate gelation. However, at lipid concentrations exceeding 15  $\mu\text{mol/mL}$ , an opposite trend was observed (data not shown), indicating that high amounts of liposomes interfered with the formation of the physical polymer crosslinks. The rheology assays performed with negatively-charged liposomes (10  $\mu\text{mol/mL}$ ) indicated that low concentrations of negative lipids can interfere with the gelation behavior resulting in gels with lower storage modulus. Indeed, negatively-charged liposomes can displace GP and bind to the residual ammonium groups of chitosan.

The liposomes containing Chol seemed to withstand incorporation into the chitosan hydrogel as shown by the freeze-fracture photomicrograph (Fig. 4.4). Furthermore, the burst release or increase in release rate which followed the addition of Triton X-100 or phospholipase A<sub>2</sub> clearly demonstrated that the integrity of the lipid bilayer could be largely preserved in the hydrogels. This is in contrast with hydrogels of poloxamers that can permeabilize lipid bilayer and trigger the rapid leakage of liposomal content (24).

The influence of the liposome characteristics on the release profile of a small molecular weight hydrophilic compound, namely CF, from the thermosensitive C/GP system was investigated. The total dye released from the liposomal gel was a combination of free and liposomal CF. The encapsulation of CF into liposomes before addition to the C/GP solution significantly prolonged CF release compared with the control gel. Release over several weeks can be expected with such a system. The release could be controlled either by adjusting the liposome size or composition. An increase in liposome size from 100 to 280 nm drastically decreased the release kinetics as well as the initial burst release. With large multilamellar liposomes, the release was almost completely abolished with less than 6% CF released after 7 days. Since gelation occurs rapidly and gel erosion is minimal over time (23), it is tempting to attribute the difference in the release rate between the 3 formulations to a difference in the liposomal coefficient diffusion. Indeed, according to the Stokes-Einstein equation, the diffusion of colloids is inversely proportional to the hydrodynamic diameter (40). Although this is probably partially true, our mathematical model suggests that an important fraction of 280 and 590 nm liposomes is virtually not released, and can be assumed to be irreversibly trapped in the gel (C<sub>5</sub>: 77.9 and 95.5%, respectively). This suggests either immobilization of large liposomes in the chitosan matrix or an extremely slow diffusion coefficient. Indeed, the pore size of these hydrogels ranges between 5-10  $\mu\text{m}$  (23), thus creating physical hindrance to the diffusion of colloids. The values of the transfer constants  $K_{12}$ ,  $K_{52}$  also reflected different stability/permeability among the different liposome formulations. For example, in the case of EPC/Chol liposomes,  $K_{12}$ ,  $K_{52}$  was

inversely related to the liposome size (Table 4.1). Faster release from small liposomes could be related to a higher specific surface area or to a lower overall stability (higher degree of curvature). Accordingly, one can anticipate that for hydrogels containing large liposomes, the *in vivo* release should be controlled either by the degradation of the chitosan matrix or long term destabilization/degradation of the lipid bilayer.

The release rate could be controlled by judiciously selecting the liposome composition. The proposed mathematical model suggests that the EPC liposomes experienced some destabilization following their incorporation in the C/GP solution as indicated by the  $C_2$  value (41.7 %) which exceeded the initial proportion of free CF (15%). As already demonstrated in a number of studies (29,41-43), the addition of 40 mol% Chol, substantially slowed down CF leakage from the liposomes. Indeed, Chol is known to reduce the bilayer permeability and increase its stability. Chol modifies the molecular packing of phospholipids, and the mixed membranes are more condensed when compared to pure phospholipids above their transition temperature (43-46). From our results and experimental model, it appears that Chol prevented massive destabilization of EPC liposomes by the hydrogel ( $C_2$ : 9.1 vs 41.7%) and further CF leakage ( $K_{12}$ ,  $K_{52}$ :  $1.56$  vs  $6.97 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). Replacing EPC with DSPC further decreased the bilayer permeability (lower  $K_{12}$ ,  $K_{52}$  value), although with 40 mol% Chol, EPC and DSPC membranes are in a comparable intermediate gel state (46). The electroneutrality of the gel (23) after neutralization with GP was confirmed by the release profile obtained with the negatively-charged liposomes, which was nearly identical to that of EPC/Chol liposomes ( $K_{13}$ :  $11.7$  vs  $13.7 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

The liposome-C/GP formulation appears as a promising system for the sustained and local delivery of small molecular weight compounds. When small liposomes are incorporated in the hydrogels and in the absence of enzyme which can degrade chitosan (*i.e.* lysozyme) (47), the release kinetics is not controlled by the erosion of the vehicle. Tagaki et al. (48,49) proposed alginate gel beads as

vehicles for liposomes. In their *in vitro* studies, release was completed in about 2.5 to 6 h. The release occurred as a result of swelling and erosion of the beads. Stenekes et al. (50) reported the design of liposome-loaded biodegradable dextran microspheres, which released intact liposomes in a time-controlled manner. The release kinetics depended only on the degradation rate of the microspheres. There was hardly any release of liposomes during the first 17 days. Release occurred between day 17 and 30, going from 10 to 80% between day 17 and 24.

As compared to amphiphilic thermosensitive gel formulations, the C/GP system seems to offer a better environment for liposomes, mainly because it is substantially devoid of surface-active properties. Additionally, the C/GP system has been shown to be biocompatible and biodegradable. Murdan et al. (51) proposed non-ionic surfactant based organogels incorporating niosomes as delivery vehicles for drugs and antigens. Their *in vitro* experiments at 37°C revealed that about 60% CF was released after 8 h suggesting that release would be completed in less than 24 h. Paavola et al. (25) reported an injectable thermosensitive liposomal gel of ibuprofen based on poloxamer 407 for epidural analgesia. The cumulative amount of drug released after 24 h was 42% for the liposomal gel compared to 58, 75 and 99% for the control gel, liposome suspension and control solution, respectively. The liposomal gel effectively decreased the release rate of a small molecular weight compound but, in this case, drug delivery would be limited to a few days. Moreover, poloxamer gels are known to erode rapidly and they are not biodegradable.

## 4.6 Conclusion

The results presented in this work indicated that the liposome-C/GP system could be used for the sustained delivery of small molecular weight hydrophilic compounds. The solution gels rapidly at 37°C as demonstrated by the rheological analysis, and the release profile of the incorporated compound can be controlled by adjusting liposome characteristics such as size and composition. Such a formulation would be best suited for local sustained release of drugs (e.g. sustained release of anticancer drugs injected intratumorally), and biomedical applications which require the local and controlled delivery of pharmaceuticals such as growth factors in tissue repair. The proposed mathematical model allowed to run accurate simulations which fitted relatively well the experimental data. This modeling helped us to understand the processes involved in the CF release from the C/GP gels although it did not take into account the physical properties of the liposomes used (i.e. size, composition). A predictive model could be made by systematically analyzing the variation of each parameter for numerous systems.

## Acknowledgements

This study was supported in part by BioSyntech Inc. (Laval, Canada), The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canada Research Chair Program. J.C. Leroux acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## 4.7 References

1. J.L. Hill-West, S.M. Chowdhury, M.J. Slepian, J.A. Hubbell, Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 91 (1994) 5967-5971.
2. J. Cappello, J.W. Crissman, M. Crissman, F.A. Ferrari, G. Textor, O. Wallis, J.R. Whitley, X. Zhou, D. Burman, L. Aukerman, E.R. Stedronsky, In-situ self-assembling protein polymer gel systems for administration, delivery, and release of drugs, *J. Controlled Release*. 53 (1998) 105-117.
3. R. Joshi, V. Arora, J.P. Desjardins, D. Robinson, K.J. Himmelstein, P.L. Iversen, In vivo properties of an in situ forming gel for parenteral delivery of macromolecular drugs, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1189-1195.
4. H.G. Choi, J.H. Jung, J.M. Ryu, S.J. Yoon, Y.K. Oh, C.K. Kim, Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository, *Int. J. Pharm.* 165 (1998) 33-44.
5. J.M. Ryu, S.J. Chung, M.H. Lee, C.K. Kim, C.K. Shim, Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum, *J. Controlled Release*. 59 (1999) 163-172.
6. R.L. Dunn, J.P. English, D.R. Cowsar, D.P. Vanderbilt, Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same, U. S. Patent 4, 938, 763 (1990).
7. M.L. Shively, B.A. Coonts, W.D. Renner, J.L. Southard, A.T. Bennett, Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system, *J. Controlled Release*. 33 (1995) 237-243.
8. R.E. Eliaz, J. Kost, Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 388-396.
9. B.O. Haglund, R. Joshi, K.J. Himmelstein, An in situ gelling system for parenteral delivery, *J. Controlled Release*. 41 (1996) 229-235.
10. T.P. Johnston, M.A. Punjabi, C.J. Froelich, Sustained delivery of interleukine-2 from a poloxamer 407 gel matrix following intraperitoneal injection in mice, *Pharm. Res.* 9 (1992) 425-434.



11. E.A. Pec, Z.G. Wout, T.P. Johnston, Biological activity of urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 626-630.
12. T. Okano, Y.H. Bae, H. Jacobs, S.W. Kim, Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release, *J. Controlled Release.* 11 (1990) 255-265.
13. R. Dinarvand, A. D'Emanuel, The use of thermoresponsive hydrogels for on-off release of molecules, *J. Controlled Release.* 36 (1995) 221-227.
14. H.H. Lin, Y.L. Cheng, In-situ thermoreversible gelation of block and star copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(*N*-isopropylacrylamide) of varying architectures, *Macromolecules.* 34 (2001) 3710-3715.
15. B. Jeong, Y.H. Bae, D.S. Lee, S.W. Kim, Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, *Nature.* 388 (1997) 860-862.
16. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions, *Macromolecules.* 32 (1999) 7064-7069.
17. B. Jeong, Y.K. Choi, Y.H. Bae, G. Zentner, S.W. Kim, New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems, *J. Controlled Release.* 62 (1999) 109-114.
18. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 171-177.
19. B. Jeong, Y.H. Bae, S.W. Kim, Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, *J. Controlled Release.* 63 (2000) 155-163.
20. B. Jeong, M.R. Kibbey, J.C. Birnbaum, Y.Y. Won, A. Gutowska, Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA, *Macromolecules.* 33 (2000) 8317-8322.
21. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials.* 21 (2000) 2155-2161.

22. A. Chenite, M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput, N. Kandani, Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydr. Polymers*. 46 (2001) 39-47.
23. E. Ruel-Gariépy, A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis, J.C. Leroux, Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs, *Int. J. Pharm.* 203 (2000) 89-98.
24. A. Bochot, E. Fattal, A. Gulik, G. Couarraze, P. Couvreur, Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1364-1369.
25. A. Paavola, I. Kilpelainen, J. Yliruusi, P. Rosenberg, Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia, *Int. J. Pharm.* 199 (2000) 85-93.
26. A.L. Weiner, S.S. Carpenter-Green, E.C. Soehngen, R.P. Lenk, M.C. Popescu, Liposome-collagen gel matrix: a novel sustained drug delivery system, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 922-925.
27. F. Szoka, D. Papahadjopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 75 (1978) 4194-4198.
28. F. Szoka, F. Olson, T. Heath, W. Vail, E. Mayhew, D. Papahadjopoulos, Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 $\mu$ m) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes, *Biochim. Biophys. Acta*. 601 (1980) 559-571.
29. D. Papahadjopoulos, S. Nir, S. Ohki, Permeability properties of phospholipid membranes: effect of cholesterol and temperature, *Biochim. Biophys. Acta*. 266 (1971) 561-583.
30. J.N. Weinstein, S. Yoshikami, P. Henkart, R. Blumenthal, W.A. Hagins, Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker, *Science*. 195 (1977) 489-492.
31. A. Merkli, J. Heller, C. Tabatabay, R. Gurny, Semi-solid hydrophobic bioerodible poly(ortho ester) for potential application in glaucoma filtering surgery, *J. Controlled Release*. 29 (1994) 105-112.
32. J.A. Jacquez, *Compartmental analysis in biology and medicine*, University of Michigan Press, Ann Arbor, MI, 1985.

33. J.A. Nelder, R. Mead, A simplex method for function minimization, *Computer J.* 7 (1965) 308-313.
34. R.L. Rardin, *Optimization in operations research*, Prentice Hall, Upper Saddle River, 1998, p. 919.
35. J. Chang, J.H. Musser, H. McGregor, Phospholipase A<sub>2</sub>: function and pharmacological regulation, *Biochem. Pharm.* 36 (1987) 2429-2436.
36. E.A. Dennis, Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13057-13060.
37. I. Henriksen, G. Smistad, J. Karlsen, Interactions between liposomes and chitosan, *Int. J. Pharm.* 101 (1994) 227-236.
38. L. Plank, C.E. Dahl, B.R. Ware, Effect of incorporation on head group separation in liposomes, *Chem. Phys. Lipids.* 36 (1985) 319-328.
39. E. Onsoyen, Chitosan as stabilizer and bioadhesive carrier in liposome formulations, in: C.J. Brine, P.A. Sandford, and J.P. Zikakis (Eds.), *Advances in chitin and chitosan*, Elsevier, London, 1992, p. 479-488.
40. P.C. Hiemenz, *Principles of colloid and surface chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York, 1986.
41. J. De Gier, C.V.M. Haest, J.G. Mandersloot, L.L.M. Van Deenen, Valinomycin-induced permeation of 86Rb<sup>+</sup> of liposomes with varying composition through the bilayers, *Biochim. Biophys. Acta.* 211 (1970) 373-375.
42. R.A. Demel, K.R. Bruckdorfer, L.L.M. Deenen, The effect of sterol structure on the permeability of liposomes to glucose, glycerol and Rb<sup>+</sup>, *Biochim. Biophys. Acta.* 255 (1972) 321-330.
43. D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, T. Isac, Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta.* 311 (1973) 330-348.
44. B.D. Ladbroke, R.M. Williams, D. Chapman, Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction, *Biochim. Biophys. Acta.* 150 (1968) 333-340.
45. D. Papahadjopoulos, M. Cowden, H. Kimelberg, Role of cholesterol in membranes effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity, *Biochim. Biophys. Acta.* 330 (1973) 8-26.

46. R.A. Demel, B. De Kruffy, The function of sterols in membranes, *Biochim. Biophys. Acta.* 457 (1976) 109-132.
47. K.I. Amano, E. Ito, The action of lysosyme on partially deacetylated chitin, *Eur. J. Biochem.* 85 (1978) 97-104.
48. I. Takagi, H. Shimizu, T. Yotsuyanagi, Application of alginate gel as a vehicle for liposomes. I. Factors affecting the loading of drug-containing liposomes and drug release, *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 1941-1947.
49. I. Takagi, H. Nakashima, M. Takagi, T. Yotsuyanagi, K. Ikeda, Application of alginate gel as a vehicle for liposomes. II. Erosion of alginate gel beads and the release of loaded liposomes, *Chem. Pharm. Bull.* 45 (1997) 389-393.
50. R.J.H. Stenekes, A.E. Loebis, C.M. Fernandes, D.J.A. Crommelin, W.E. Hennink, Controlled release of liposomes from biodegradable dextran microspheres: a novel delivery concept, *Pharm. Res.* 17 (2000) 690-695.
51. S. Murdan, G. Gregoriadis, A.T. Florence, Sorbitan monostearate/polysorbate 20 organogels containing niosomes: a delivery vehicle for antigens ?, *Eur. J. Pharm. Sci.* 8 (1999) 177-185.

## **CHAPITRE 5**

### **GELS D'HEXARÉLINE**

## 5 Gels d'hexaréline

### 5.1 Introduction

Les hormones sont des substances dotées d'une activité biologique spécifique, synthétisées dans les glandes et transportées par le sang vers d'autres organes ou tissus au niveau desquels elles exercent leur influence sur divers processus biochimiques. L'hormone de croissance ("*growth hormone*", GH), aussi appelée somatotrophine, est produite par les cellules somatotropes de l'hypophyse. La sécrétion de cette hormone est régie principalement par l'action stimulante de la somatocrinine ("*growth hormone releasing hormone*", GHRH) et par l'action inhibitrice de la somatostatine ("*growth hormone inhibiting hormone*", GHIH). La sécrétion de l'hormone de croissance est pulsatile et culmine pendant le sommeil nocturne. L'hormone de croissance exerce plusieurs fonctions telles la régulation de la synthèse des protéines, la régulation du métabolisme des graisses et des sucres et le développement de la structure osseuse et de la masse musculaire (1, 2).

Chez les enfants, cette hormone stimule la croissance. Elle peut également stimuler la production, par le foie, d'un facteur de croissance spécial: le facteur de croissance apparenté à l'insuline 1 ("*insulin-like growth factor-1*", IGF-I) (2). On dit qu'un enfant souffre d'un déficit en hormone de croissance lorsque sa croissance est sous la normale, que son âge osseux est inférieur à son âge chronologique ("*delayed bone age*") et qu'il n'y a pas atteinte d'un niveau sérologique normal d'hormone de croissance en réponse à au moins 2 épreuves de stimulation de la libération de GH (2).

Les enfants atteints d'un déficit en hormone de croissance présentent différents signes caractéristiques (2, 3). D'abord, ils ont un taux de croissance anormalement lent. Ensuite, une dégradation déficiente des graisses entraîne une concentration de tissus adipeux plus élevée que la normale, surtout autour de la taille. Enfin, leur masse maigre, se reflétant particulièrement dans le développement musculaire, est proportionnellement plus faible que la normale en raison d'une mauvaise synthèse des protéines.

Un déficit de l'hormone de croissance chez l'adulte entraîne différents effets (3-7). Ces patients ont tendance à accumuler de la graisse, surtout au niveau de l'abdomen. On observe aussi une augmentation du taux de cholestérol et des LDL ("*low density lipoproteins*", mauvais cholestérol) accompagnée d'une diminution des HDL ("*high density lipoproteins*", bon cholestérol). La masse musculaire est réduite, affectant alors la performance physique. La densité osseuse diminue, augmentant les risques de fracture. Bon nombre de patients éprouvent également une baisse d'énergie et de vitalité.

Les premiers traitements à base d'hormone de croissance extraite d'hypophyses de cadavres humains ont été rapportés dans les années 1950. Au milieu des années 1980, des cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob ont été reliés à l'utilisation de ces préparations d'hormone et elles furent retirées du marché. Peu de temps après, les premiers produits synthétiques issus de la biotechnologie ont fait leur apparition. L'hormone de croissance synthétique renferme la même séquence d'acides aminés que celle d'origine hypophysaire et constitue présentement le traitement standard dans les cas de déficiences (2).

Chez les enfants atteints de déficience en hormone de croissance, l'hormonothérapie augmente la vitesse de croissance et la concentration d'IGF-1, de manière similaire à l'hormone d'origine naturelle (2). Chez les adultes, elle diminue la graisse corporelle, augmente la masse musculaire et améliore la

capacité à l'exercice (2, 7, 8). Elle diminue également les taux de cholestérol (total et LDL) ce qui peut réduire les risques de maladie cardiaque (8). De plus, elle augmente la densité osseuse (2, 7). Enfin, elle entraîne un regain d'énergie et améliore l'humeur des patients (2, 4, 7, 8).

Les formulations d'hormone de croissance recombinante actuellement disponibles au Canada (Humatrope<sup>®</sup>, Nutropin<sup>®</sup>, Nutropin<sup>®</sup> AQ, Protropin<sup>®</sup>, Saizen<sup>®</sup> et Serostim<sup>®</sup>) nécessitent une administration par injection intramusculaire ou sous-cutanée 3, 6 ou 7 fois par semaine. Une seule formulation à libération prolongée est présentement disponible (aux États-Unis seulement). Il s'agit d'une formulation dépôt à base de microsphères (Nutropin Depot<sup>®</sup>) qui permet de diminuer le nombre d'injections à 1 ou 2 par mois.

Même si les traitements avec l'hormone de croissance sont très efficaces, les coûts de production élevés et les effets secondaires rencontrés (9) ont poussé l'industrie pharmaceutique à chercher des alternatives. La plus étudiée consiste à recourir à des peptides synthétiques capables de stimuler la sécrétion d'hormone de croissance. Ces derniers, appelés "*growth hormone-releasing peptides*" (GHRP), ne ressemblent pas à l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH) du point de vue structurel (10) et agissent *via* des récepteurs spécifiques, différents de ceux de la GHRH, présents au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus. L'hexaréline est un de ces peptides. Il s'agit d'un hexapeptide (887 Da) dont la structure chimique est présentée à la figure 5.1.



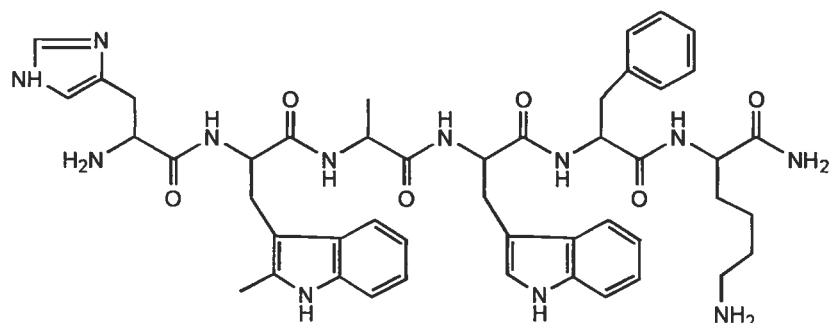


Figure 5.1 Structure chimique de l'hexaréline. Tiré de (11).

L'hexaréline stimule la sécrétion d'hormone de croissance chez plusieurs espèces animales dont l'humain (12-15). Son activité est plus importante que celle de la GHRH chez des volontaires sains et ce, suivant une administration intra-veineuse, sous-cutanée, intra-nasale ou orale (14, 16-20). L'effet pharmacologique est relié à l'âge du sujet et est plus important chez les jeunes patients (13, 18). Chez des enfants de petite taille ("*familial short stature*"), il a été démontré que l'hexaréline entraînait une sécrétion importante d'hormone de croissance suite à une administration intra-veineuse ou intra-nasale (19, 21). Des études à long terme ont révélé qu'elle pouvait accélérer la croissance de ces enfants après administration intra-nasale 3 fois par jour sur une période variant de 3 à 10 mois (22, 23). Dans l'étude de Laron *et al.* (22), la croissance des enfants est passée de  $5.3 \pm 0.8$  à  $8.3 \pm 1.7$  cm/année. Les auteurs ont ainsi montré que l'hexaréline n'a pas seulement un effet à court terme, mais qu'elle peut augmenter la production de GH et de IGF-1 lors d'une administration chronique et ainsi avoir des effets promoteurs de croissance.

Peu d'études pharmacocinétiques ont été effectuées avec l'hexaréline. Aucune étude pharmacocinétique chez l'humain n'a été publiée. Des données chez le rat et chez le chien ont été rapportées par Roumi *et al.* (24, 25). Selon leurs résultats, la demi-vie du peptide est  $\sim 76$  min chez le rat et  $\sim 120$  min chez le chien suite à une injection par la voie intra-veineuse. Les auteurs ont également montré que l'hexaréline était rapidement absorbée suite à une injection sous-

cutanée, atteignant des concentrations plasmatiques maximales après 10-20 min (rat) et 25-37 min (chien). Il a également été déterminé que l'hexaréline s'accumulait préférentiellement au niveau du foie, des reins et du duodénum. Son excrétion a lieu majoritairement par la voie biliaire, 50% de la dose injectée ayant été récupérée dans la bile 2 h après l'injection et 60% après 24 h. Ce phénomène explique la présence marquée d'hexaréline au niveau du duodénum. Une partie est également éliminée dans l'urine (22%) et dans les fèces (10%). L'hexaréline n'est pas métabolisée chez le rat.

Les formulations d'hexaréline utilisées lors des essais cliniques étaient destinées à la voie intra-veineuse ou intra-nasale. Étant donné la courte demi-vie du peptide dans l'organisme, l'administration devait être répétée fréquemment. Par exemple, la formulation intra-nasale nécessitait 3 prises par jour. Une formulation à libération prolongée serait donc très intéressante. Elle permettrait de limiter le nombre de prises et d'augmenter l'observance des patients. Au chapitre 4, nous avons montré qu'une solution thermosensible à base de chitosan contenant des liposomes pouvait contrôler la libération d'une petite molécule hydrophile (carboxyfluorescéine) sur une période de 2 semaines ou plus *in vitro*. Nous avons entrepris des essais avec l'hexaréline afin de vérifier si notre formulation permettait une libération contrôlée *in vivo*. L'hexaréline a été choisie pour ces essais car une méthode de dosage du peptide dans le plasma de rat était déjà au point. Cette technique a été mise au point par Marie Roumi dans le laboratoire du Dr. Huy Ong. Dans un premier temps, nous avons optimisé la préparation des liposomes, puis nous avons procédé à l'étude pharmacocinétique chez le rat.

## 5.2 Produits et méthodes

### 5.2.1 Produits

Les liposomes étaient composés de phosphatidylcholine d'œuf (EPC) et de cholestérol (Chol) (Northern Lipids, Vancouver, CB). La solution thermosensible était à base d'hydrochlorure de chitosan ayant un degré de désacétylation de 95% (C95) (Pronova Biopolymer, Oslo, Norvège) et de  $\beta$ -glycérophosphate (GP) (Sigma, St-Louis, MO, USA). L'hexaréline était fournie par Europeptides (Argenteuil, France). Pour toutes les préparations, de l'eau distillée et déionisée à l'aide d'un système Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA) a été utilisée.

### 5.2.2 Préparation des liposomes

Les liposomes ont été préparés par la technique "REV" ("*reverse-phase evaporation method*") (26, 27). Les lipides (EPC:Chol 3:2 mol:mol, 30 mmol) dissous dans le chloroforme ont été déposés sur les parois d'un tube par évaporation du solvant. Le film de lipides a ensuite été dissous dans une phase organique (éther) et une phase aqueuse (Hepes 20 mM, NaCl 144 mM) contenant l'hexaréline a été ajoutée (481  $\mu\text{g/mL}$  lors des essais d'incorporation, 2 mg/mL lors des essais *in vivo*). Le mélange a été placé dans un bain à ultrasons pendant 2 min afin d'obtenir une émulsion homogène, puis l'éther a été évaporé sous vide. Les préparations ont été soumises à la sonde à ultrasons (3 min) ou ont été extrudées afin d'obtenir une taille définie et uniforme de liposomes. Lors de l'extrusion, des membranes de polycarbonate ayant des pores de 200 nm ont été utilisées pour les essais d'incorporation et de 800 nm pour l'étude pharmacocinétique. L'hexaréline non encapsulée a été séparée des liposomes par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex G-100 ou G-50, Amersham

Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). La taille des liposomes a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière.

### 5.2.3 Détermination du taux d'incorporation d'hexaréline dans les liposomes

Afin de déterminer le taux d'incorporation de l'hexaréline dans les liposomes, plusieurs fractions (~1 mL) ont été recueillies après le passage de la suspension sur la colonne de Sephadex. Ces fractions ont été analysées pour en déterminer le contenu en hexaréline. La méthode de dosage était basée sur celle décrite pour un autre pentapeptide contenant du tryptophane, un acide aminé fluorescent présent dans la molécule d'hexaréline (28). Chaque fraction (200  $\mu$ L) a été diluée dans un tampon (1000  $\mu$ L) contenant 300 mM d'Hepes, 150 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et 2.0% (*p/v*) d'acide cholique (pH 7.5), puis analysée ( $\lambda_{\text{ex}}$  280 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  354 nm) à l'aide d'un fluorimètre Aminco-Bowman Series 2 (Spectronics Instrument, Rochester, NY, USA). Le contenu en hexaréline ( $\mu$ g) de chaque fraction a été calculé grâce à une droite d'étalonnage et une courbe d'élution a été établie (Fig. 5.2). Le taux d'incorporation a été déterminé avec les aires sous la courbe des deux pics sachant que le premier représentait l'hexaréline contenue dans les liposomes et le second, l'hexaréline libre.

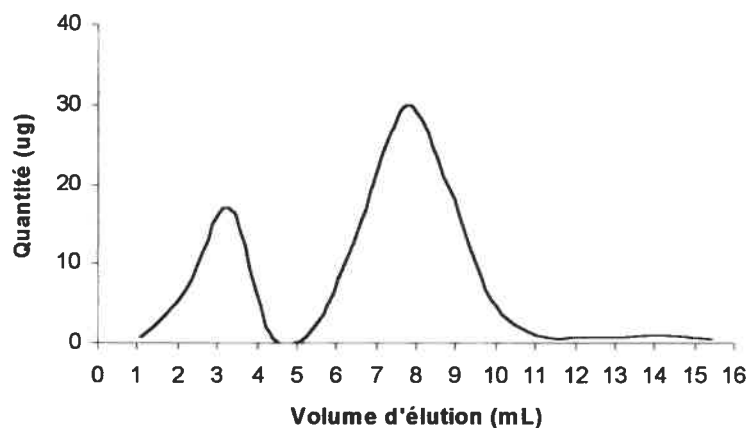


Figure 5.2 Profil d'élution des liposomes et de l'hexaréline non encapsulée.

### 5.2.4 Préparation de la solution thermosensible

Une solution aqueuse de chitosan (C95) et une solution aqueuse de GP ont été préparées. Ensuite, les deux solutions ont été refroidies à  $\sim 4^{\circ}\text{C}$  dans un bain de glace, puis la solution de GP a été ajoutée progressivement à la solution de chitosan. Pour l'étude de libération *in vitro*, 3 g de solution thermosensible ont été mélangés à 400  $\mu\text{L}$  de solution d'hexaréline (1.7 mg/mL). La formulation destinée aux rats était composée de 4 g de solution thermosensible et 535  $\mu\text{L}$  de liposomes d'hexaréline. Les quantités ont été ajustées de façon à ce que la préparation finale contienne 1.8% (*p/v*) de chitosan et 3.6% (*p/v*) de GP après l'ajout des liposomes.

### 5.2.5 Étude de libération *in vitro*

L'étude de libération a été effectuée à l'aide des cellules à flux continu (voir section 1.5.6). Les échantillons de gel (300 mg) contenant ou non de l'hexaréline libre (non encapsulée dans des liposomes) ont été déposés dans une cupule au-dessus de laquelle circulait un tampon phosphate salin (PBS, pH 7.4). Le tampon sortant des cellules a été récupéré afin d'en évaluer le contenu en hexaréline. La température des cellules a été maintenue à  $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  tout au long de l'expérience.

L'hexaréline présente dans le PBS a été dosée à l'aide d'un essai radioimmunologique (24, 25). Pour ce faire, 100  $\mu\text{L}$  d'hexaréline marquée à l'iode 125 ( $^{125}\text{I}$ ), 100  $\mu\text{L}$  d'antisérum et 25  $\mu\text{L}$  d'échantillon ont été mélangés. Le volume a été complété à 525  $\mu\text{L}$  avec une solution tampon (8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM EDTA potassique, 0.02% (*p/v*)  $\text{NaN}_3$ , 0.02% (*v/v*) Triton X-100 et 0.2% (*p/v*) lysozyme, pH 7.2). Les mélanges ont été incubés pendant 18 h à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les fractions d'hexaréline libres et liées à

l'anticorps ont été séparées par l'ajout de 500  $\mu\text{L}$  d'un réactif immunoprécipitant composé de 0.2% (v/v) de gamma globulines ("*Anti-goat rabbit gamma globuline serum*", Immunocorp, Montréal, QC) dans une solution de polyéthylène glycol (PEG<sub>8000</sub>) (Sigma, St-Louis, MO, USA) 12% (p/v). Les tubes ont été placés à 4°C pendant 15 min puis centrifugés 20 min (2000 g, 4°C). Le surnageant a été aspiré et la radioactivité du culot mesurée à l'aide d'un compteur de radioactivité Gammamaster LKB Wallac 1277 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Woodbridge, Ont, Canada). Les quantités d'hexaréline présentent dans chaque échantillon ont été déterminées à l'aide d'une droite d'étalonnage.

### 5.2.6 Étude pharmacocinétique

Quatre formulations différentes ont été préparées: une solution d'hexaréline, des liposomes contenant de l'hexaréline, un gel thermosensible d'hexaréline et un gel thermosensible contenant des liposomes d'hexaréline. Chaque préparation contenait 118  $\mu\text{g/mL}$  d'hexaréline.

Les formulations ont été injectées par la voie sous-cutanée (au niveau du bas du dos) à des rats mâles Sprague-Dawley pesant ~400 g. Chaque rat a reçu 400  $\mu\text{L}$  de formulation contenant 47  $\mu\text{g}$  d'hexaréline (118  $\mu\text{g/kg}$ ). À différents temps, 300  $\mu\text{L}$  de sang ont été recueillis par la veine caudale. Les échantillons sanguins ont été centrifugés pendant 15 min (450 g, 4°C). Le plasma a été isolé puis congelé à -80°C jusqu'à l'analyse. Le contenu en hexaréline de chaque échantillon a été déterminé à l'aide de l'essai radioimmunologique décrit plus haut.

## 5.3 Résultats

### 5.3.1 Optimisation de la taille des liposomes et du taux d'incorporation

Des liposomes à base d'EPC et de Chol préparés à l'aide de la technique REV ont été utilisés car ils ont donné de bons résultats lors des études précédentes (voir chapitre 4). L'hexaréline ayant tendance à s'adsorber sur le verre, une technique autre que l'extrusion (utilisant des seringues de verre) fut d'abord envisagée pour réduire et uniformiser la taille des liposomes. La technique choisie fut l'utilisation d'une sonde à ultrasons. Après quelques essais, il s'est avéré que cette technique ne permettait pas d'obtenir des liposomes de même taille de façon reproductible (Tableau 5.1). L'extrusion a donc été utilisée. Cette dernière permet l'obtention de liposomes de taille semblable d'un lot à l'autre et un taux d'incorporation plus élevé d'hexaréline (Tableau 5.1). Une certaine perte de peptide a cependant été observée avec ce procédé (0-12%) probablement causée majoritairement par l'adsorption de l'hexaréline sur les seringues en verre utilisées lors de l'extrusion et sur la membrane de polycarbonate.

Tableau 5.1 Influence de la méthode de préparation des liposomes sur leur diamètre et sur le taux d'incorporation d'hexaréline.

Essai	Méthode utilisée	Taille des liposomes (nm)	Hexaréline incorporée (%)
1	Sonde ultrasons	175 ± 65	27
2	Sonde ultrasons	88 ± 40	24
3	Sonde ultrasons	103 ± 43	26
4	Extrusion	157 ± 46	36
5	Extrusion	163 ± 35	34
6	Extrusion	162 ± 34	39

### 5.3.2 Libération *in vitro*

L'étude de libération *in vitro* visait à vérifier que l'hexaréline était libérée du gel de manière similaire aux composés hydrophiles de petite taille testés préalablement, tels que la carboxyfluorescéine. La collecte des échantillons a été arrêtée après 48 h car les petites molécules hydrosolubles sont habituellement entièrement libérées après ce délai (chapitre 4).

Les données recueillies indiquent que la libération d'hexaréline est incomplète (Fig. 5.3). En effet, la libération atteint un plateau après 28 h même s'il n'y a que 20% de l'hexaréline qui a été libérée.

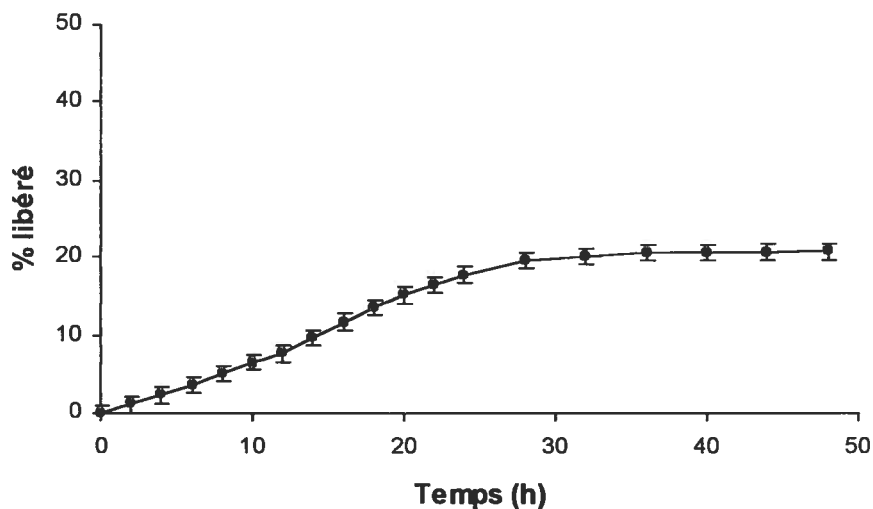


Figure 5.3 Libération de l'hexaréline à partir de la solution thermosensible chitosan/GP (196  $\mu\text{g}$  hexaréline/g mélange). Moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ).

Différents phénomènes peuvent expliquer ce profil de libération et seront discutés dans la prochaine section.



Malgré ces résultats décevants, l'étude *in vivo* a été effectuée afin de vérifier si une dégradation plus importante du gel chez l'animal permettait l'obtention d'un meilleur profil de libération de l'hexaréline.

### 5.3.3 Étude pharmacocinétique

Dans cette expérience, quatre formulations différentes contenant de l'hexaréline ont été testées et les profils plasmatiques résultant de l'injection sous-cutanée de chacune d'elle sont présentés à la figure 5.4.

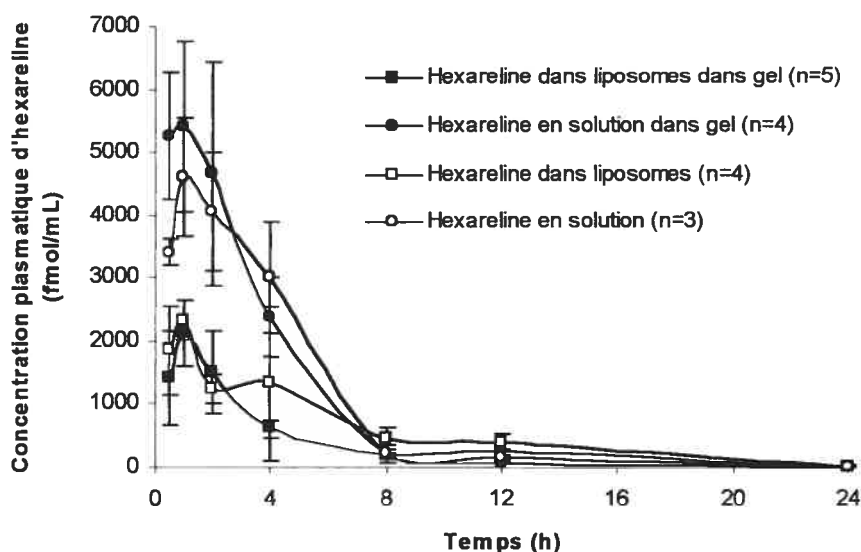


Figure 5.4 Libération de l'hexaréline après injection sous-cutanée de différentes formulations d'hexaréline chez le rat (118  $\mu\text{g/kg}$ ). Moyenne  $\pm$  SEM.

Dans le cadre de l'étude pharmacocinétique, des liposomes ayant une taille moyenne de  $342 \pm 112$  nm ont été utilisés. Ces derniers sont plus gros que ceux présentés au tableau 5.1 (88-175 nm). Les études de libération *in vitro* rapportées au chapitre 4 ont montré que les liposomes ayant une taille autour de 300 nm entraînaient une libération beaucoup plus lente que ceux d'environ 100

nm (Fig. 4.3). Étant donné que lors de l'étude *in vivo* des phénomènes de dégradation, absents de l'étude *in vitro*, pouvaient accélérer la libération, des liposomes de plus grande taille ont été utilisés afin d'obtenir une libération soutenue sur une plus longue période.

Les données *in vivo* corroborent nos résultats *in vitro* (chapitre 4). En effet, l'utilisation de liposomes permet de ralentir la libération des composés hydrosolubles de petite taille à partir de la solution thermosensible à base de chitosan. Le pic initial de libération est environ deux fois plus faible lorsque l'hexaréline est encapsulée dans les liposomes avant d'être incorporée dans le gel (2119 vs 5416 fmol/mL). Une réduction du pic plasmatique initial est également observé lorsque les liposomes sont comparés à la solution, en absence de gel (2331 vs 4605 fmol/mL). De plus, les concentrations plasmatiques sont similaires en présence et en absence de gel. Cette dernière observation surprend puisqu'un effet modérateur du gel sur la libération du principe actif était attendu. La nature aqueuse du gel peut expliquer ce phénomène. L'hexaréline étant très soluble dans le gel, elle diffuse rapidement hors de celui-ci et se retrouve alors dans la circulation sanguine. L'hexaréline en solution injectée par la voie sous-cutanée seule ou dans le gel donne donc un profil plasmatique semblable. Les liposomes augmentent le temps nécessaire à l'hexaréline pour se retrouver dans la circulation sanguine. Mais qu'ils soient seuls ou dispersés dans le gel, la diffusion de l'hexaréline après sa fuite des liposomes se produit à une vitesse similaire, ce qui conduit à des profils plasmatiques identiques. Après 8 h de libération, ce sont les liposomes seuls qui donnent les taux plasmatiques les plus élevés (451 fmol/mL) et la seule formulation produisant des taux détectables à 24h (16 fmol/mL). Les autres approches entraînent des taux plasmatiques environ 2 fois plus faibles à 8 et 12 h.

## 5.4 Discussion

L'hexaréline est présentement une des avenues étudiées pour remplacer l'hormone de croissance dans le traitement des patients souffrant d'une déficience en cette dernière. Beaucoup d'études ont été effectuées sur l'hexaréline et ont révélé un effet pharmacologique intéressant. Dans les études cliniques, l'hexaréline était administrée par voie intra-veineuse ou intra-nasale. Bien que la formulation intra-nasale soit plus intéressante que la formulation injectable, elle requiert une administration trois fois par jour ce qui peut diminuer l'observance au traitement. Une formulation à libération prolongée serait donc avantageuse. Nous avons donc entrepris de vérifier si le mélange liposome/solution thermosensible à base de chitosan présenté au chapitre 4 pouvait être utilisé pour libérer l'hexaréline de façon prolongée suite à une administration par la voie sous-cutanée.

Nos premiers essais *in vitro* ont montré que la méthode utilisée pour préparer les liposomes influençait la reproductibilité de la taille et le taux d'incorporation de l'hexaréline. L'extrusion permettait d'obtenir une taille semblable d'un lot à l'autre alors que la sonde à ultrasons donnait des résultats variables. L'extrusion diminue la taille des liposomes grâce à une membrane ayant des pores d'une grandeur déterminée. Un nombre de passages similaire à travers la membrane d'un lot à l'autre permet l'obtention d'une taille finale semblable. La sonde à ultrasons permet également de modifier la taille des liposomes, mais le résultat est moins prévisible. En effet, le processus de sonication n'entraîne pas une scission homogène des liposomes (29). Certains liposomes de grande taille sont stables et non affectés par la sonication. De plus, il peut y avoir des zones du mélange où les liposomes ne subissent pas les effets de la sonication.

Quant au taux d'incorporation d'hexaréline, il était plus élevé suite à l'extrusion qu'à la sonication. Un survol de la littérature indique que l'incorporation de protéines à l'intérieur de liposomes donne des résultats très variables. Par exemple, dans le cas de l'insuline (chaîne A 21 acides aminés et chaîne B 30 acides aminés, 5800 Da), des taux d'incorporation variant entre 1 et 26% ont été rapportés (30-34). Pour ce qui est de la calcitonine (32 acides aminés, 3432 Da), 15 à 53% des quantités utilisées ont été incorporées (35-37). Anderson *et al.* (38) ont étudié différentes cytokines (IL-1, IL-6, GM-CSF, interféron- $\gamma$ ) et ont obtenu des taux d'incorporation allant de 19 à 80%.

La composition des liposomes ainsi que la méthode de préparation influencent le taux d'incorporation. Par exemple, dans l'étude de Dapergolas et Gregoriadis (32), 9-11% de l'insuline était incorporée dans les liposomes à base d'EPC et seulement 1.0-2.3% dans ceux à base de dimyristoyl phosphatidylcholine. De même, Ariën *et al.* ont montré que l'ajout de stéarylamine (SA) à l'EPC et au cholestérol permettait d'augmenter l'incorporation de la calcitonine (EPC/Chol 46% vs EPC/Chol/SA 53%) (35). Dans le cas de l'interféron  $\alpha$  (39) et du facteur de stimulation des granulocytes ("*granulocyte colony stimulating factor*", rhG-CSF) (40), des taux d'incorporation variant de 56 à 78% et de 2 à 90% ont été obtenus respectivement, selon la composition des liposomes et la méthode de préparation. Ariën *et al.* (35, 36) ont également étudié l'influence de la méthode de préparation des liposomes sur l'incorporation de la calcitonine. Ils ont montré que la sonication permettait une incorporation plus importante que l'extrusion pour des liposomes EPC/Chol (46.2% vs 45.1%) (35) ainsi que pour des liposomes EPC/Chol/SA (45.1% vs 40.8%) (35) (23.9% vs 20.2%) (36).

Ces derniers résultats (35, 36) sont en contradiction avec ceux présentés au tableau 5.1. En effet, le taux d'incorporation de l'hexaréline était plus élevé suite à l'extrusion (34-39%) qu'à la sonication (24-27%). Il faut cependant souligner que dans les études de Ariën *et al.*, la différence d'incorporation était

plus marquée avec les liposomes cationiques (EPC/Chol/SA) qu'avec les liposomes neutres (EPC/Chol). En effet, pour les liposomes neutres, la différence entre la sonication et l'extrusion était de 1.1% (46.2% vs 45.1%), ce qui est peu significatif. Il faut également mentionner que leur temps de sonication était beaucoup plus long que le nôtre (30 vs 3 min). Dans notre cas, il est possible que l'hexaréline ait été mieux incorporée lors du processus d'extrusion parce que cette méthode a entraîné une formation plus importante de liposomes unilamellaires que la sonication. De façon générale, les variations observées d'une étude à l'autre et d'une méthode à l'autre soulignent l'importance d'évaluer différents protocoles afin d'identifier le plus approprié pour une application donnée.

L'extrusion permet une incorporation plus importante d'hexaréline dans les liposomes, mais elle entraîne également une légère perte de peptide. Ce phénomène est peu rapporté dans les études. Yamabe *et al.* (37) ont évalué les pertes de principe actif lors de l'extrusion avec une molécule modèle ("*brilliant blue*"). Ils ont obtenu une valeur de 28%. Les auteurs attribuent leur résultat à l'adsorption du marqueur sur la membrane d'extrusion (polycarbonate). Cette donnée est plus élevée que ce que nous avons obtenu avec l'hexaréline (0-12%). Cette différence peut être attribuée au fait que nous n'avons employé qu'une seule membrane d'extrusion (200 nm) alors qu'ils en ont utilisé trois (800, 400 et 100 nm), ce qui augmente la surface d'adsorption.

L'étude de libération *in vitro* a révélé que l'hexaréline (non encapsulée dans des liposomes) n'est pas complètement libérée du gel après 48 h. En effet, seulement 18% de l'hexaréline était récupérée après 24 h et 21% après 48 h. Différents phénomènes peuvent expliquer ces résultats. D'abord, étant donné que l'hexaréline a tendance à s'adsorber sur le verre et que les cellules de libération sont en verre, il est possible qu'elle se soit adsorbée en partie sur les parois des cellules après sa sortie du gel. De plus, l'hexaréline est chargée positivement en solution. Il pourrait donc y avoir eu interaction avec le gel puisque ce dernier possède des charges résiduelles négatives (2.6 moles de  $\text{PO}_4^{2-}$  par mole de  $\text{NH}_3^+$ ).

Au chapitre 3, il a été montré que lorsque la concentration d'une molécule chargée était faible ( $< 0.2\%$ ), il n'y avait pas d'interaction avec le gel. Puisque la concentration d'hexaréline dans le gel était de  $0.02\%$ , les interactions électrostatiques sont peu susceptibles d'être responsables de la faible libération observée. L'explication la plus plausible est donc l'adsorption de l'hexaréline sur les parois des cellules de libération.

La libération *in vivo* s'est prolongée sur environ 24 h, tel qu'observé *in vitro*. Malgré des prélèvements effectués sur environ un mois, aucun échantillon ne contenait des quantités décelables d'hexaréline après ce temps. Dans cette expérience, des liposomes ayant une taille moyenne de  $342 \pm 112$  nm ont été utilisés et chaque animal a reçu  $47 \mu\text{g}$  d'hexaréline. Les données recueillies au chapitre 4 montrent que des liposomes ayant une taille moyenne de 280 nm entraînent une libération de 13% au cours des premières 24 heures suivie d'une libération de  $\sim 2\%$ /jour. Si l'hexaréline se comporte de la même manière que la carboxyfluorescéine, il y aura une libération rapide d'hexaréline à partir de la formulation liposome/solution thermosensible au cours des 24 premières heures, puis une très lente par la suite. L'étude pharmacocinétique de Roumi *et al.* présentée plus haut (25) a révélé que l'administration d'hexaréline par la voie sous-cutanée chez le rat entraînait un pic plasmatique  $\sim 15$  minutes après l'injection. Les concentrations plasmatiques redescendaient ensuite progressivement pendant  $\sim 3$  h. Les auteurs ont calculé une demi-vie de  $\sim 60$  minutes. Cette étude (25) a aussi montré que 47% de la dose injectée par la voie sous-cutanée se retrouvait dans la bile après 2 h et que l'excrétion urinaire était la plus importante au cours des 8 premières heures. Ces résultats montrent que suite à une injection sous-cutanée, l'hexaréline ne reste pas longtemps au niveau plasmatique. Il est donc possible que la libération d'hexaréline à partir du système liposome/solution thermosensible injecté au niveau sous-cutané ne permette pas de maintenir des taux plasmatiques décelables après la libération initiale ("*burst*") parce qu'elle est trop lente par rapport à la clairance. Ce phénomène entraîne des concentrations plasmatiques à l'équilibre trop faibles pour être décelées.

Le système liposome/solution thermosensible a eu le même effet dans cette étude *in vivo* que lors des études *in vitro* (chapitre 4), soit la diminution de la vitesse de libération de la molécule encapsulée. Toutefois, ce n'est pas le gel qui limitait la libération. En effet, que les liposomes soient injectés seuls ou qu'ils soient incorporés dans le gel, le résultat est semblable. Un phénomène similaire a été rapporté par DiTizio *et al.* (41, 42). Dans leurs études de libération de la ciprofloxacine à partir de liposomes libres ou incorporés dans un gel de gélatine, les profils de libération étaient identiques. On peut donc affirmer que le facteur limitant la libération est la diffusion du principe actif hors des liposomes. Les gels sont suffisamment poreux pour ne pas entraver la diffusion de principes actifs vers le milieu de libération.

## 5.5 Conclusion

Les résultats obtenus lors des expériences avec l'hexaréline ont montré que la formulation liposome/solution thermosensible n'était pas appropriée pour l'administration prolongée d'un peptide dont le site d'action est physiquement éloigné du site de libération (administration systémique). La libération initiale est suffisamment importante pour atteindre des taux plasmatiques mesurables, mais la libération subséquente est trop lente. L'élimination du peptide est plus rapide que sa libération à partir du gel. De plus, le gel n'a pas d'effet modérateur sur la libération de l'hexaréline. Seuls les liposomes permettent de la ralentir.

## 5.6 Bibliographie

1. E.N. Marieb, Le système endocrinien, in: E.d.r. pédagogique (Eds.), Anatomie et physiologie humaines, Saint-Laurent (Qc), 1998, p. 588-624.
2. A.M. Heck, J.A. Yanovski, K.A. Calis, Pituitary gland disorders, in: J.T. DiPiro (Eds.), Pharmacotherapy. A pathophysiologic approach, McGraw-Hill, New York, 2002, p. 1395-1411.
3. S.M. Shalet, A. Toogood, A. Rahim, B.M.D. Brennan, The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults, *Endocr. Rev.* 19 (1998) 203-223.
4. G.A. McGauley, R.C. Cuneo, F. Salomon, P.H. Sönksen, Psychological well-being before and after growth hormone treatment in adults with growth hormone deficiency, *Horm. Res.* 33 (1990) 52-54.
5. R.C. Cuneo, F. Salomon, C. Mark Wiles, P.H. Sönksen, Skeletal muscle performance in adults with growth hormone deficiency, *Horm. Res.* 33 (1990) 55-60.
6. J.M. Kaufman, P. Taelman, A. Vermeulen, M. Vandeweghe, Bone mineral status in growth hormone-deficient males with isolated and multiple pituitary deficiencies of childhood onset, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74 (1992) 118-123.
7. H. Gharib, *et al.*, American association of clinical endocrinologists medical guidelines for clinical practice for growth hormone use in adults and children - 2003 update, *Endocr. Pract.* 9 (2003) 64-76.
8. R.C. Cuneo, *et al.*, The australian multicenter trial of growth hormone (GH) treatment in GH-deficient adults, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 107-116.
9. R.L. Hintz, Untoward events in patients treated with growth hormone in the USA, *Horm. Res.* 38 (1992) 44-49.
10. F.A. Momany, C.Y. Bowers, G.A. Reynolds, A. Hong, K. Newlander, Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides, *Endocrinology.* 114 (1984) 1531-1536.



11. C. Westberg, K. Benkestock, A. Fatouros, M. Svensson, B. Sjöström, Hexarelin - evaluation of factors influencing oral bioavailability and ways to improve absorption, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 1257-1264.
12. R. Deghenghi, M.M. Cananzi, A. Torsello, C. Battisti, E.E. Muller, V. Locatelli, GH-releasing activity of hexarelin, a new growth hormone releasing peptide, in infant and adult rats, *Life Sci.* 54 (1994) 1321-1328.
13. S.G. Cella, V. Locatelli, M. Poratelli, V. De Gennaro Colonna, B.P. Imbimbo, R. Deghenghi, E.E. Müller, Hexarelin, a potent GHRP analogue: Interactions with GHRH and clonidine in young and aged dogs, *Peptides*. 16 (1995) 81-86.
14. E. Ghigo, E. Arvat, L. Gianotti, B.P. Imbimbo, V. Lenaerts, R. Deghenghi, F. Camanni, Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (1994) 693-698.
15. B.P. Imbimbo, T. Mant, M. Edwards, D. Amin, N. Dalton, F. Boutignon, V. Lenaerts, P. Wüthrich, R. Deghenghi, Growth hormone-releasing activity of hexarelin in humans. A dose-response study, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 46 (1994) 421-425.
16. M. Maccario, E. Arvat, M. Procopio, L. Gianotti, S. Grottoli, B.P. Imbimbo, V. Lenaerts, R. Deghenghi, F. Camanni, E. Ghigo, Metabolic modulation of the growth hormone-releasing activity of hexarelin in man, *Metabolism*. 44 (1995) 134-138.
17. E. Arvat, L. Gianotti, L. Di Vito, B.P. Imbimbo, V. Lenaerts, R. Deghenghi, F. Camanni, E. Ghigo, Modulation of growth hormone-releasing activity of hexarelin in man, *Neuroendocrinology*. 61 (1995) 51-56.
18. E. Arvat, L. Gianotti, S. Grottoli, B.P. Imbimbo, V. Lenaerts, R. Deghenghi, F. Camanni, E. Ghigo, Arginine and growth hormone-releasing hormone restore the blunted growth hormone-releasing activity of hexarelin in elderly subjects, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 1440-1443.
19. S. Loche, P. Cambiaso, D. Carta, S. Setzu, B.P. Imbimbo, P. Borrelli, C. Pintor, M. Cappa, The growth hormone-releasing activity of hexarelin, a

- new synthetic hexapeptide, in short normal and obese children and in hypopituitary subjects, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995) 674-678.
20. J. Bellone, G. Aimaretti, E. Bartolotta, L. Benso, B.P. Imbimbo, V. Lenhaerts, R. Deghenghi, F. Camanni, E. Ghigo, Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, before and during puberty, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995) 1090-1094.
  21. Z. Laron, J. Frenkel, I. Gil-Ad, B. Klinger, E. Lubin, P. Wuthrich, F. Boutignon, V. Lengerts, R. Deghenghi, Growth hormone releasing activity by intranasal administration of a synthetic hexapeptide (hexarelin), *Clin. Endocrinol.* 41 (1994) 539-541.
  22. Z. Laron, J. Frenkel, R. Deghenghi, S. Anin, B. Klinger, A. Silbergeld, Intranasal administration of the GHRP hexarelin accelerates growth in short children, *Clin. Endocrinol.* 43 (1995) 631-635.
  23. B. Klinger, a. Silbergeld, R. Deghenghi, J. Frenkel, Z. Laron, Desensitization from long-term intranasal treatment with hexarelin does not interfere with the biological effects of this growth hormone-releasing peptide in short children, *Eur. J. Endocrinol.* 134 (1996) 716-719.
  24. M. Roumi, V. Lenaerts, F. Boutignon, P. Wuthrich, R. Deghenghi, M. Bellemare, A. Adam, H. Ong, Radioimmunoassay for hexarelin, a peptidic growth hormone secretagogue, and its pharmacokinetic studies, *Peptides.* 16 (1995) 1301-1306.
  25. M. Roumi, S. Marleau, P. Du Souich, T. Maggi, R. Deghenghi, H. Ong, Kinetics and disposition of hexarelin, a peptidic growth hormone secretagogue, in rats, *Drug Metab. Dispos.* 28 (2000) 44-50.
  26. F. Szoka, D. Papahadjopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75 (1978) 4194-4198.
  27. F. Szoka, F. Olson, T. Heath, W. Vail, E. Mayhew, D. Papahadjopoulos, Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 $\mu$ m) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes, *Biochim. Biophys. Acta.* 601 (1980) 559-571.
  28. A.C. Chakrabarti, I. Clark-Lewis, P.R. Harrigan, P.R. Cullis, Uptake of basic amino acids and peptides into liposomes in response to transmembrane pH gradients, *Biophys. J.* 61 (1992) 228-234.

29. J.A.N. Zasadzinski, Transmission electron microscopy observations of sonication-induced changes in liposome structure, *Biophys. J.* 49 (1986) 1119-1130.
30. H.M. Patel, B.E. Ryman, Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes, *FEBS Lett.* 62 (1976) 60-63.
31. G. Dapergolas, G. Gregoriadis, Hypoglycaemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats, *Lancet.* 2 (1976) 824-827.
32. G. Dapergolas, G. Gregoriadis, The effect of liposomal lipid composition on the fate and effect of liposome-entrapped insulin and tubocurarine, *Biochem. Soc. Trans.* 5 (1977) 1383-1386.
33. J. Arrieta-Molero, K. Aleck, M.K. Sinha, C.M. Brownschidle, L.J. Shapiro, M.A. Sperling, Orally administered liposome-entrapped insulin in diabetic animals, *Horm. Res.* 16 (1982) 249-256.
34. S.M. Rennie, B.S. Park, V.A. Zammit, A switch in the direction of the effect of insulin on the partitioning of hepatic fatty acids for the formation of secreted triacylglycerol occurs in vivo, as predicted from studies with perfused livers, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 935-941.
35. A. Ariën, C. Goigoux, C. Baquey, B. Dupuy, Study of in vitro and in vivo stability of liposomes loaded with calcitonin or indium in the gastrointestinal tract, *Life Sci.* 53 (1993) 1279-1290.
36. A. Arien, B. Dupuy, Encapsulation of calcitonin in liposomes depends on the vesicle preparation method, *J. Microencapsulation.* 14 (1997) 753-760.
37. K. Yamabe, Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida, Potentiality of double liposomes containing salmon calcitonin as an oral dosage form, *J. Controlled Release.* 89 (2003) 429-436.
38. P.M. Anderson, D.C. Hanson, D.E. Hasz, M.R. Halet, B.R. Blazar, A.C. Ochoa, Cytokines in liposomes: Preliminary studies with IL-1, IL-6, GM-CSF and interferon-gamma, *Cytokine.* 6 (1994) 92-101.
39. M. Foldvari, M.E. Baca-Estrada, Z. He, J. Hu, S. Attah-Poku, M. King, Dermal and transdermal delivery of protein pharmaceuticals: lipid-based delivery systems for interferon alpha, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30 (1999) 129-137.

40. J. Meyer, L. Whitcomb, D. Collins, Efficient encapsulation of proteins within liposomes for slow release in vivo, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 433-438.
41. V. DiTizio, G.W. Ferguson, M.W. Mittelman, A.E. Khoury, A.W. Bruce, F. DiCosmo, A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters, *Biomaterials*. 19 (1998) 1877-1884.
42. V. DiTizio, C. Karlgard, L. Lilge, A. Khoury, M.W. Mittelman, F. DiCosmo, Localized drug delivery using crosslinked gelatin gels containing liposomes: Factors influencing liposome stability and drug release, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 96-106.

## **CHAPITRE 6**

### **A THERMOSENSITIVE CHITOSAN-BASED HYDROGEL FOR THE LOCAL DELIVERY OF PACLITAXEL**

## 6 A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel

Eve Ruel-Gariépy<sup>a</sup>, Matthew Shive<sup>b</sup>, Ali Bichara<sup>b</sup>, Mohammed. Berrada<sup>b</sup>,  
Dorothée Le Garrec<sup>a</sup>, Abdellatif Chenite<sup>b</sup>, J.C. Leroux<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Canada Research Chair in Drug Delivery, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>b</sup>BioSyntech Inc., 475 Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada, H7V 4B3

\*Corresponding author: Tel.: +1-514-343-6455, Fax: +1-514-343-7738

Reprinted from European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57 (2004) 53-63 with permission from Elsevier.

### 6.1 Abstract

A novel injectable thermosensitive *in situ* gelling hydrogel has been developed. The system, which falls under the BST-Gel™ platform technology developed at Biosyntech Inc. (Laval, QC, Canada), consists of a chitosan solution neutralized with  $\beta$ -glycerophosphate that is liquid at room temperature but gels when heated to body temperature. We propose to use this thermosensitive hydrogel for the sustained release of paclitaxel at tumor resection sites in order to prevent local tumor recurrence. The *in vitro* release profiles demonstrated controlled delivery over 1 month. The initial drug loading substantially affected the release. Local delivery of paclitaxel from the formulation injected intratumorally was investigated using EMT-6 tumors implanted subcutaneously on Balb/c mice. These experiments showed that 1 intratumoral injection of the thermosensitive hydrogel containing paclitaxel was as efficacious as 4

intravenous injections of Taxol® in inhibiting the growth of EMT-6 cancer cells in mice, but in a less toxic manner. Further histological analysis revealed that while the proportion of necrotic areas was similar for the C/GP/paclitaxel and the Taxol®-treated tumors, a disparity between tumor-associated inflammatory cell populations may suggest differing antitumor mechanisms.

**Keywords:** chitosan, thermosensitivity, hydrogel, sustained delivery, paclitaxel

## 6.2 Introduction

Excluding cancers of the skin, breast cancer is the most frequently diagnosed cancer among women. An estimated 211,300 new cases of invasive breast cancer are expected to occur among women in the United States during 2003, and breast cancer will be the second leading cause of cancer death in American women behind lung cancer (American Cancer Society Inc., Surveillance Research, 2003). Almost all women with breast cancer will have some type of surgery in the course of their treatment. The purpose of many of these surgeries is to remove as much of the cancerous tissue as possible, as in a lumpectomy. However, the risk of recurrence stemming from residual malignant cells still exists, and may be averted through administration of local radiotherapy or systemic chemotherapy.

Paclitaxel is one of the best antineoplastic drugs found in nature in the past decades. It interacts with tubulin dimers in the G2 mitotic phase of cell division to promote microtubule polymerisation that results in the formation of highly stable microtubules, thus preventing cell division (1). Paclitaxel success to date is largely due to its unique mechanism of action against tumors and its ability to work in combination with other anticancer therapeutic agents. It has excellent

therapeutic efficacy for a wide spectrum of cancers, especially for ovarian and breast cancer.

However, paclitaxel is a hydrophobic molecule that is poorly soluble in water. Currently, Cremophor® EL, a non-ionic polyethoxylated castor oil solubilizer, is used to enable its clinical administration. Although it has a history of use with other drugs, the amount of Cremophor® EL necessary to deliver the required doses of paclitaxel is significantly higher than that administered with any other marketed drug. This causes serious side effects, particularly hypersensitivity reactions, some of which are life-threatening (2-4). The incidence of those reactions can be substantially reduced by the use of prophylactic antiallergic premedications, but this is undesired as it increases the treatment burden.

In order to eliminate the toxicity of Cremophor® EL, to improve efficacy and eliminate premedication, current paclitaxel research is focused on developing new drug delivery systems which circumvent the Cremophor® EL difficulty associated with its use. A variety of approaches have been investigated including emulsification (5-7), microspheres (8,9), liposomes (10-12), nanoparticles (13,14) and polymeric micelles (15,16).

However, each drug delivery approach has unique inherent difficulties. Stable emulsions are hard to achieve and drug loading is often limited (*i.e.* high volumes needed to achieve therapeutic concentration) (5). Likewise, satisfactory entrapment efficiency can sometimes be problematic with nanoparticles, microspheres and liposomes. Harper *et al.* (8) noted in their paper that high doses of the Paclimer Delivery System (microspheres) were not investigated, in large part because of anticipated difficulties in administering large volumes into tumor nodules. As for micelles, their disassembly upon injection, due to dilution, can result in burst release and toxic effects.



Another therapeutic approach to combating solid tumors and preventing metastasis and tumor re-growth, involves surgical removal of the tumor followed by implantation of a biodegradable device loaded with an antineoplastic agent in the resulting cavity. This method would provide high local drug concentration, effectively destroying surviving malignant cells and would also prevent the systemic side-effects of chemotherapy normally associated with its intravenous administration. Since local recurrence of tumors generally occurs near the original excision site, this treatment modality is more desirable than a systemic one. Implantation of drug-loaded devices (including drug-polymer composites) into tumors or tumor resection sites has been investigated by several workers (17-24).

A material which has large potential for use as an injectable *in situ* gelling drug delivery device can be obtained from a chitosan solution (C) neutralized with a polyol counterionic dibase salt such as  $\beta$ -glycerophosphate (GP). This thermosensitive C/GP solution, which falls under the BST-Gel™ platform technology developed at Biosyntech Inc. (Laval, QC, Canada), is liquid at room temperature and solidifies into a hydrogel as temperature is increased to body temperature (Fig. 6.1) (25-27). The objective of this work was to evaluate the C/GP thermosensitive formulation as the basis for local chemotherapy. The *in vitro* release profiles of paclitaxel from within the gel were first investigated, and the antitumoral activity of paclitaxel released from the gel was then assessed *in vivo* using the EMT-6 murine mammary carcinoma model.

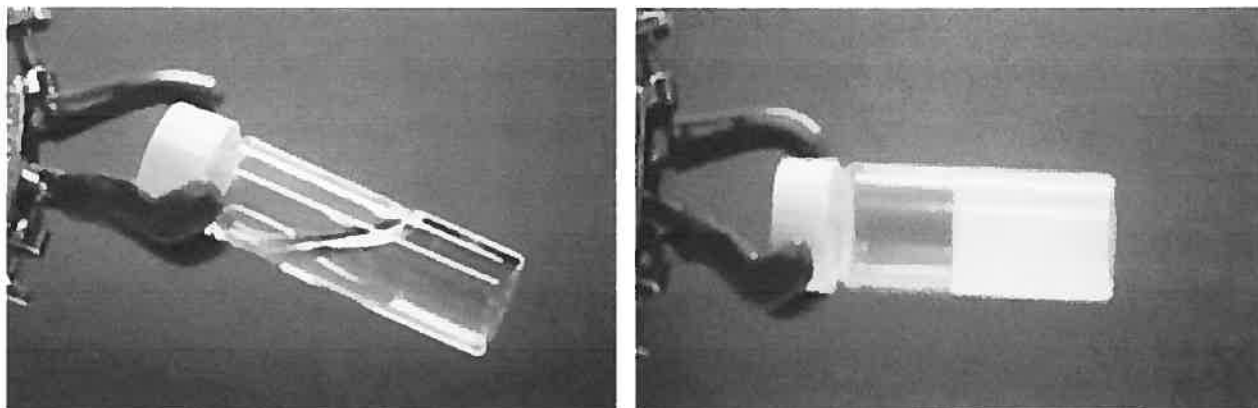


Figure 6.1 The C/GP formulation at room temperature (left) and at 37°C (right).

## 6.3 Materials and methods

### 6.3.1 Materials

Medical grade chitosan (Ultrasan<sup>™</sup>,  $M_w$  228,700, P.I. 1.61) having a deacetylation degree of 95% was obtained from Biosyntech Inc. (Laval, QC, Canada). GP and sodium dodecyl sulfate were from Sigma (St. Louis, MO). Paclitaxel was purchased from Bioxel Pharma (Ste-Foy, QC, Canada). Taxol<sup>®</sup> (Bristol-Myers Squibb) was purchased in a retail pharmacy. All other chemicals were reagent grade. All products were used as received. Deionized distilled water from a Milli-Q water system of Millipore (Fisher Scientific Limited, Nepean, ON, Canada) was used to prepare the aqueous solutions. The EMT-6 murine carcinoma cells were a gift from Prof. van Lier of the University Hospital of Sherbrooke (QC, Canada). Cell culture medium (Waymouth) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, ON, Canada).

### 6.3.2 Preparation of the chitosan/glycerophosphate (C/GP) solution

First, a chitosan solution was prepared in deionized water and sterilized in an autoclave (121°C, 10 min) (28). Second, a GP solution was prepared in deionized water and sterilized by filtration. The two solutions were chilled in an ice bath for 15 min. The GP solution was added dropwise to the chitosan solution under stirring and the resulting mixture was stirred for another 10 min under aseptic conditions. The formulation containing paclitaxel was prepared by pouring the chitosan solution directly on the sterilized drug powder (see section 2.4) and stirring during 4 h before mixing with the GP solution as described above. The final preparations contained 1.8 % (w/w) chitosan, 3.6 % (w/w) GP and either 0.64 or 6.4 % (w/v) paclitaxel.

### 6.3.3 *In vitro* release studies

Samples of 300 mg of the C/GP solution with or without paclitaxel were placed into circular-shaped molds (diameter 8 mm) and allowed to gel in an incubator at 37°C for 12 h. The circular shaped gels were removed, placed into histology cassettes and suspended in 500 mL of isotonic phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 0.3 % (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS). SDS was included in the release medium to increase the solubility of paclitaxel. The bottles were placed in a shaking incubator at 37°C and 100 rpm. At the allotted times, 200-μL aliquots of the release medium were collected and stored at -80°C until analysis. Preliminary studies revealed a slight degradation of paclitaxel after 4 days in the release medium. In order to avoid this phenomenon and to maintain sink conditions, the gels were transferred into fresh medium pre-warmed at 37°C after each sampling. In the collected fractions, paclitaxel concentration was determined by HPLC using a slightly modified version of a published method (19,21). The analysis was performed using a mobile phase of

acetonitrile/water/methanol (48:41:11 v/v) at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> (Gilson model 302, Middleton, WI), a C<sub>18</sub> Nova-Pak column (Waters, Milford, MA), and UV detection (Gilson model 116, Middleton, WI) at 242 nm. An internal standard (*N*-heptylbenzamide, NHBZ) was added to each sample in order to correct for inter-injection variation (29).

#### 6.3.4 Stability of paclitaxel after $\gamma$ -irradiation

The drug powder was sterilized using 25 kGy  $\gamma$ -irradiation from a <sup>60</sup>Co source (MDS Nordion Inc., Laval, QC, Canada). Irradiated paclitaxel samples were stored at 4°C along with non-irradiated powder. After 1 and 2 months, non-irradiated and irradiated samples were analyzed by HPLC (same conditions as in the *in vitro* release studies).

#### 6.3.5 *In vivo* anti-tumor activity

Balb/c female mice weighing 15-17 g were purchased from Charles River Laboratory (Montreal, QC, Canada) and acclimatized for 7 days after arrival. The mice were provided with food and water *ad libitum*, and were maintained in an environment with alternating 12 h of light and darkness. Two separate studies were conducted where each mouse was injected subcutaneously in the posteriolateral flank with 2 X 10<sup>5</sup> EMT-6 cells suspended in 50  $\mu$ L of Waymouth supplemented with 10 % FBS (v/v). The treatment was initiated in the first study when the tumor reached 30 mm<sup>3</sup> ( $L \times W \times H \times \pi / 6$ , between day 6 and 9 after inoculation) and 4 days after inoculation in the subsequent one. For each study, the mice were randomly assigned to one of the four treatment groups. The negative control group received 0.2 mL/day of intravenous (IV) saline *via* the caudal vein during 4 days (treatment day 0, 1, 2 and 3). The positive control group received 10 mg/kg/day of paclitaxel IV (Taxol<sup>®</sup> 6 mg/mL diluted in saline

to 0.8 mg/mL) *via* the caudal vein during 4 days (treatment day 0, 1, 2 and 3). One treatment group received 10 µL of C/GP solution intratumorally (IT) and the second treatment group received 10 µL of C/GP solution containing 64 mg/mL of paclitaxel (equivalent to 40 mg/kg) IT, both on treatment day 0. Tumors were measured with calipers and animal weights were obtained every day during the first 9 days and then every other day. The animals were sacrificed after 17 days of observation and the tumors collected for histological analysis. Both studies were terminated at this time point since preliminary studies showed tumor necrosis in non-treated animals after this point. Any tumor effects were evaluated on the basis of the change in tumor volume. Toxicity was assessed by the evolution of the weight of the animals following treatment. All animal care and studies were approved by the Animal Welfare and Ethics Committee of the University of Montreal.

### 6.3.6 Histology analysis

Immediately after necropsy, tumors were retrieved whole, along with adjacent tissues and fixed in 10% neutral buffered formalin (Fisher Scientific Limited, Nepean, ON, Canada) for 2 weeks at 4°C. Each tumor was then bisected manually with a blade, and for C/GP-treated tumors, macroscopic localization of the implant site was attempted. This portion of the tumor was embedded in paraffin, and serially sectioned using 5-6 µm thickness. Staining was accomplished using Saffranin-O/Fast Green, a proprietary process optimized at Biosyntech Inc. (Laval, QC, Canada) for use with BST-Gels™. Histology of stained tumor sections was examined using light microscopy with an Olympus CX40 (Carsen Group Inc., Markham, ON, Canada), and images were captured using a Spot Insight color digital camera (Focus Corp., Seoul, South Korea).

### 6.3.7 Statistical analysis

The *in vivo* data were subjected to a multiple comparison test: analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis if the data did not fulfill the requirements for the ANOVA test. If the null hypothesis was rejected, pairwise comparison was done (Tukey, Scheffé, Nemenyi or Dunn) to determine where the difference lied.  $p < 0.05$  was considered significant. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## 6.4 Results

### 6.4.1 *In vitro* release studies

In order to understand the ability of the C/GP gel to effectively deliver paclitaxel in a sustained fashion, *in vitro* release studies were performed in PBS/SDS 0.3% at 37°C under sink conditions. Fig. 6.2 shows the resulting release profiles of paclitaxel from the C/GP hydrogel. It clearly demonstrates that the initial drug loading substantially affects the release rate, the latter being reduced at higher drug loading. The initial burst effect was lower (7.0% vs 16.6%) and the release rate was slower (2.0%/day from day 2 to 10 vs 4.2%/day) for the 64 mg/mL- vs 6.4 mg/mL-loaded gel. This resulted in a 92% cumulative release for the 6.4 mg/mL-loaded gel compared to a 43% cumulative release for the 64 mg/mL-loaded gel after 1 month. Close inspection of the gels at the end of the experiment revealed that the gels loaded with 64 mg/mL of paclitaxel were still white with only a small rim of translucent gel on the outer part, in contrast to the 6.4 mg/mL gels which were almost completely translucent (similar to the unloaded control gel) with only a point of white in the center (data not shown). This suggests a potential for sustained delivery at higher loading rates in this hydrogel.

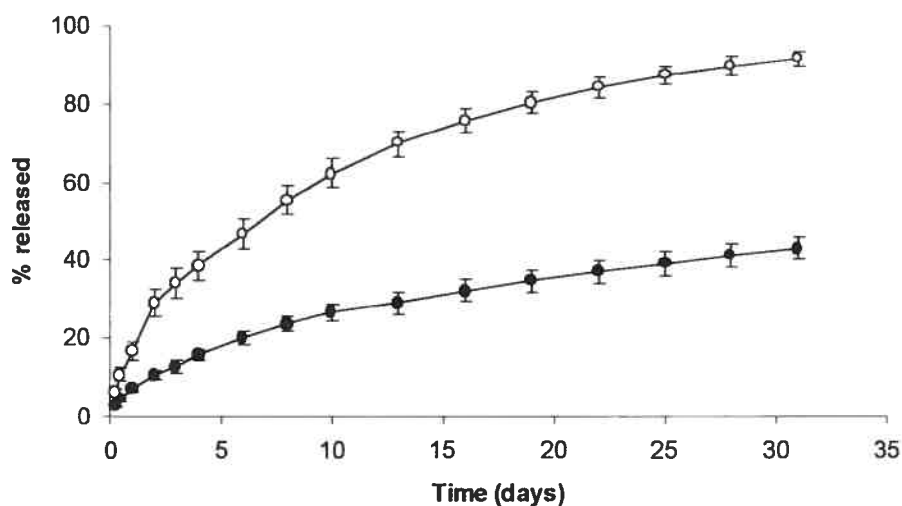


Figure 6.2 *In vitro* cumulative percent release of paclitaxel from the C/GP gel in PBS + 0.3% SDS at 37°C. Initial paclitaxel loading: 64 mg/mL (closed circles), 6.4 mg/mL (open circles). Each point represents the mean value  $\pm$  SEM (n=5).

#### 6.4.2 Stability of paclitaxel after $\gamma$ -irradiation

The ability to sterilize an injectable drug is a critical parameter, which we investigated here using  $\gamma$ -irradiation. The HPLC analysis of irradiated paclitaxel gave similar results for all samples (Fig. 6.3). The samples irradiated at 25 kGy and kept at 4°C for either 1 or 2 months gave spectra that were identical to those of the non-irradiated samples (control) evaluated in parallel. Irradiation of the paclitaxel powder did not induce degradation since no secondary peaks were detected and the height of the peaks of the non-irradiated and irradiated samples were similar. This demonstrates that paclitaxel remains stable after irradiation, and can be kept at 4°C for at least 2 months.

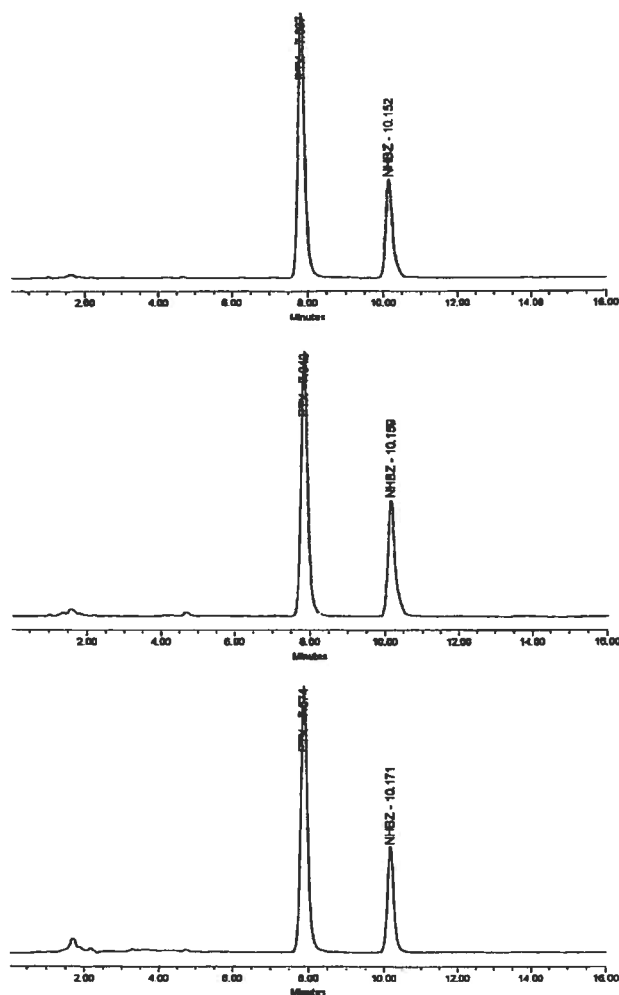


Figure 6.3 HPLC spectra of paclitaxel non-irradiated (A), irradiated and stored one month at 4°C (B) and irradiated and stored two months at 4°C (C). Paclitaxel elutes at 7.8 min and the internal standard (*N*-heptylbenzamide) elutes at 10.1 min.



### 6.4.3 *In vivo* anti-tumor activity

Local delivery of paclitaxel from the formulation injected intratumorally was investigated using EMT-6 tumors implanted subcutaneously on Balb/c mice. Two separate studies were conducted, and in the first, the treatment was initiated when the tumors reached a volume of 30 mm<sup>3</sup> (day 6-9 after inoculation). This size was chosen in order to facilitate intratumoral injections. Figure 6.4 shows that there was a clear difference in growth between the negative control (saline IV) tumors and all other treatment groups. Over the 17 days of observation, the saline-treated tumors grew to  $9.2 \pm 1.0$  times their original size whereas the other groups showed only a  $5.5 \pm 0.6$  to  $5.7 \pm 0.4$  times increase, which represent a 38-40 % growth inhibition. The difference was statistically significant from day 8. In the second study, the treatment was initiated on the fourth day of tumor growth. At this point, the tumors were generally very small and not always visually detectable. This time point was chosen in order to mimic a population of malignant cells remaining after primary tumor removal surgery. Figure 6.5 shows that this study also demonstrated a significant difference between tumor growth in the negative control (saline IV) group and both paclitaxel groups (Taxol<sup>®</sup> IV and C/GP/paclitaxel). However, the same did not hold for the C/GP group, which did not demonstrate a marked growth inhibition. Over the 17 days of observation, the saline-treated tumors grew to  $18.5 \pm 2.6$  times their original size, the paclitaxel groups showed only a  $5.5 \pm 0.8$  to  $5.6 \pm 0.9$  times increase and the C/GP-treated tumors grew  $12.4 \pm 4.4$  times. The difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ) between the negative control group (saline IV) and the C/GP/paclitaxel group from day 3 of the experiment. The difference was statistically significant ( $p < 0.05$ ) between the negative control group (saline IV) and the positive control group (Taxol<sup>®</sup> IV) at day 15 of the experiment. These experiments indicate that the C/GP/paclitaxel treatment has a significant ability to delay tumor growth, in a similar manner to Taxol<sup>®</sup> treatment alone. In addition, it showed that 1 intratumoral injection of the thermosensitive hydrogel containing paclitaxel was as efficacious as 4 intravenous injections of Taxol<sup>®</sup> in inhibiting the growth of EMT-6 cancer cells in mice, but in a less toxic manner.

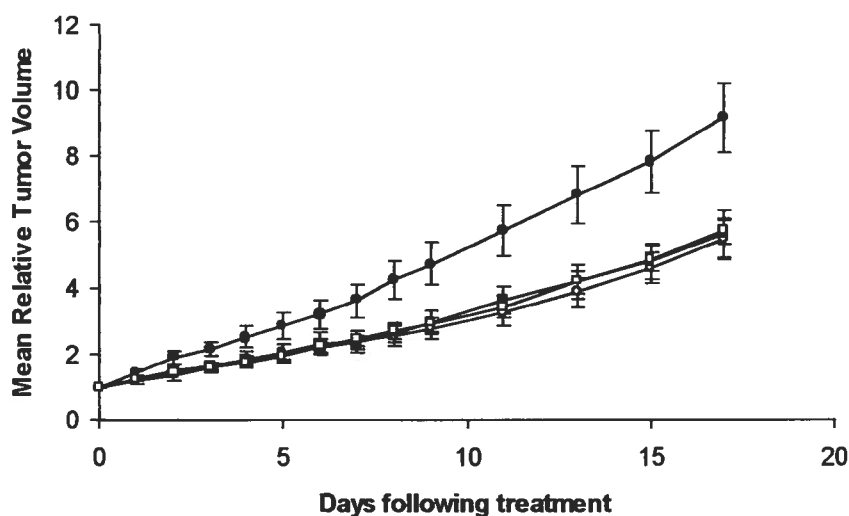


Figure 6.4 *In vivo* anti-tumor effect of the treatments initiated when the tumors reached 30 mm<sup>3</sup>. Saline 0.2 mL/day IV x 4 days (closed circles, n = 10), Taxol® 10 mg/kg/day IV x 4 days (open circles, n = 12), C/GP solution 10 µL intratumoral (closed squares, n = 15) and paclitaxel/C/GP solution (64 mg/mL paclitaxel) 10 µL (40 mg/kg paclitaxel) intratumoral (open squares, n = 15).

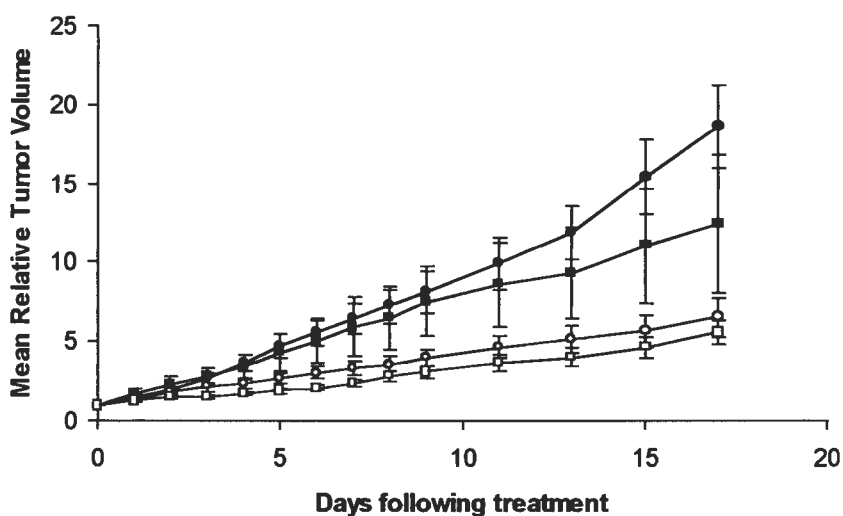


Figure 6.5 *In vivo* anti-tumor effect for treatments initiated on day 4 after tumor inoculation. Saline 0.2 mL/day IV x 4 days (closed circles, n = 8), Taxol® 10 mg/kg/day IV x 4 days (open circles, n = 8), C/GP solution 10 µL intratumoral (closed squares, n = 8) and paclitaxel/C/GP solution (64 mg/mL paclitaxel) 10 µL (40 mg/kg paclitaxel) intratumoral (open squares, n = 8).

The mice receiving Taxol<sup>®</sup> displayed weight loss throughout the first 6-7 days of the experiments, peaking at day 4-5, whereas the mice receiving C/GP/paclitaxel had weight curves similar to those of the saline-treated mice (Fig. 6.6). Only one set of data is shown since the results are similar for the two experiments. The difference between the weight of the mice receiving Taxol<sup>®</sup> and the weight of the others was statistically significant ( $p < 0.05$ ) from day 1 to day 6 or 7, in the second and first study respectively.

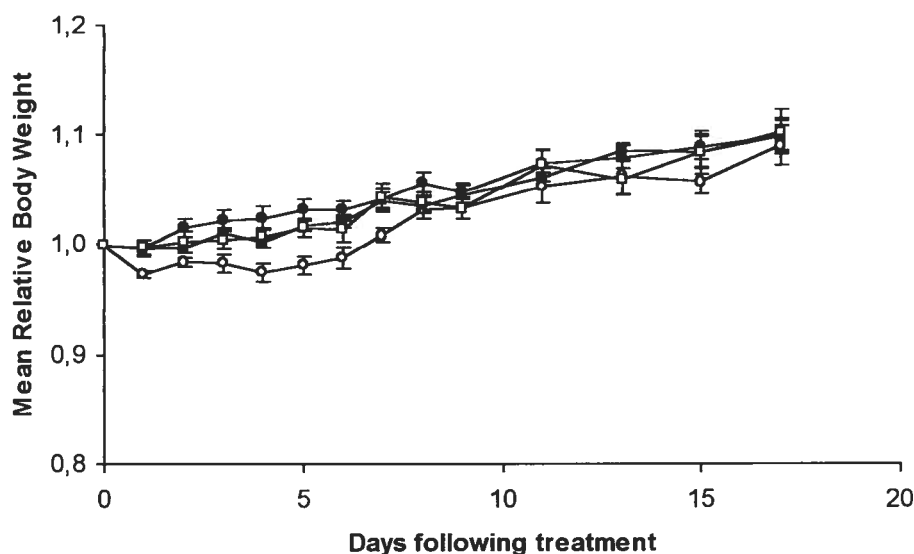


Figure 6.6 Body weight of the animals for treatments initiated on day 4 after tumor inoculation. Saline 0.2 mL/day IV x 4 days (closed circles,  $n = 8$ ), Taxol<sup>®</sup> 10 mg/kg/day IV x 4 days (open circles,  $n = 8$ ), C/GP solution 10  $\mu$ L intratumoral (closed squares,  $n = 8$ ) and paclitaxel/C/GP solution (64 mg/mL paclitaxel) 10  $\mu$ L (40 mg/kg paclitaxel) intratumoral (open squares,  $n = 8$ ).

#### 6.4.4 Histology studies

All tumors demonstrated some level of necrosis. This was observed as variably-sized regions containing necrotic tissue (cell fragments, nuclear debris and/or pyknotic cells) interdispersed between regions of viable tumor cells. The severity of necrosis decreased radially from the center, with all tumors

demonstrating necrosis deep in their centers (Fig. 6.7). Compared with tumors from the positive control group (Taxol<sup>®</sup> IV) and the two C/GP groups (with or without paclitaxel), tumors from the negative control group (saline IV) demonstrated the lowest necrotic proportions. The intratumoral cell population appeared viable, with a lack of infiltrating leukocytes, and a lack of hematological observations. This is easily observed in Fig. 6.7 A, where darkly stained cell regions are viable tumor zones. This is in contrast with the tumors of the C/GP groups and the positive control group (Taxol<sup>®</sup> IV), which contained much larger percentages of necrotic regions (Fig. 6.7 B-D). In addition, these groups contained regions composed of tumor cells in various conditions, and in some cases were mixed viable and necrotic populations. This resulted in the appearance of less intense staining. In the C/GP groups, inflammatory cell populations had infiltrated the tumor to a large extent, likely a result of increased permeability of the new vessels visualized within the tumors. Hyperemic areas were also commonly observed in those groups, with mixed erythrocyte and inflammatory cell populations. C/GP material was not identified in all treated tumors, while in others it was found peripheral to the tumor (Fig. 7B, white arrow). This may imply either material degradation or migration following breakup of the gel over time, but the results suggest either mechanism maintains antitumoral effects. Tumors with identified C/GP material remaining also contained large macrophage populations. Tumors from the positive control group (Taxol<sup>®</sup> IV), while also having large necrotic zones, failed to exhibit inflammatory cell infiltration or hyperemia.

Excluding size differences, all tumors from animals receiving treatment either at 4 days or after reaching 30 mm<sup>3</sup> varied in similar manners histologically, according to treatment.



**Figure 6.7** Tumor cross-sections demonstrating necrotic zones. Differential staining observed represents varying tumor cell conditions. A) Saline IV: darkly stained zones demonstrate areas with viable and active tumor cells. Spontaneous necrosis (light or no stain) can also be seen. B) Paclitaxel/C/GP: white arrow identifies remaining C/GP material. Tumor center has a notable lack of darkly stained viable tumor cell zones. C) C/GP material alone: clearly defined zones of necrosis are visible. D) Taxol IV: clearly defined zones of necrosis are visible. (Magnification: 4X).

## 6.5 Discussion

Local control of tumors is a primary clinical objective and is usually achieved by surgery or radiation. However, local recurrence of tumors generally occurs near the previous surgical excision site of the primary tumor. In order to prevent this phenomenon, locoregional adjuvant chemotherapy has been proposed by several investigators (18,21,23,30). In the present work, we evaluated a new thermosensitive formulation as the basis for local chemotherapy. The chitosan-based solution we developed remains liquid at room temperature and turn into a gel as temperature increases to body temperature (25-27). The formulation can be easily injected through a needle at the tumor resection site and, in a uniform manner, cover any residual cancerous cells on the margins of the cavity as it sets into a gel.

The use of paclitaxel in such systems is not new. Zentner *et al.* (22) reported that a biodegradable thermal poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) gel with paclitaxel maintained release in a controlled fashion over 50 days. In that study, the release of paclitaxel over the first 2 weeks was consistent with a diffusion-controlled mechanism, but thereafter, faster release was consistent with a combined diffusion/polymer degradation mechanism. Winternitz *et al.* (18) used a surgical paste of poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) and methoxypolyethylene glycol (MePEG) for the controlled delivery of paclitaxel which was characterized by an initial burst lasting 1 or 2 days followed by a period of sustained slow drug release. Our lower loading level (6.4 mg/mL) gel which had a similar drug load as the materials used by Zentner *et al.* (2 mg/mL) resulted in the release of 62% of the drug load after 10 days, and 92% after 1 month compared to approximately 39% and 65 % for identical time intervals. As well, our higher drug loaded gel (6.4%) which was more similar to the pastes of Winternitz *et al.* (5%), resulted in the release of 35% after 20 days compared to 20 to 26% for different pastes. In a previous paper (27), we showed that with low molecular weight hydrophilic compounds (<1000

g/mol), more than 80% of the incorporated drug was released during the first 24 h. For example, calcein, a hydrophilic compound with a molecular weight of 623 g/mol, was completely released from a 0.2% (w/w) loaded gel in 48 h. The C/GP system can thus sustain the delivery of hydrophobic drugs such as paclitaxel for at least one month which is a reasonable time span for an injectable sustained-release delivery system. Moreover, this formulation offers some advantages over other systems. Zentner *et al.* (22) reported that the onset of gelation of PLA-PEG-PLA was at 14°C and that the transition to the solid-like gel state was complete around 18°C for a 23% (w/w) polymer solution. A transition temperature too close to room temperature complicates handling of the preparation. On the other hand, the need to heat the surgical paste of Winternitz *et al.* (18) for delivery is impractical. Our formulation is liquid at room temperature for hours and is thus easily injected.

The release of paclitaxel from the BST-Gel™ was concentration-dependent, where higher loading resulted in slower release. Since paclitaxel is dispersed in the formulation, it requires dissolution prior to diffusion from the gel. Higuchi developed an equation for the release of a drug from an ointment base and later applied it to diffusion of solid drugs dispersed in homogeneous matrix dosage systems (31,32). One form of the equation (Eq. 6.1) indicates that the amount of drug released at time  $t$  per unit area of exposure ( $Q$ ) is proportional to the square root of the total concentration, dissolved and undissolved, of drug in the matrix ( $A$ ), the diffusion coefficient of the drug in the matrix ( $D$ ), the solubility of the drug in the matrix ( $C_s$ ), and the time ( $t$ ).

$$Q = \sqrt{2ADC_s t} \quad \text{Eq. (6.1)}$$

In our study, if all the variables except drug loading remained identical, the ten times difference between the two drug loadings should result in a 3.2-times difference in the amount of drug released at each time point. In fact, we

obtained a 3.0 to 3.9 ratio between the amount of drug released in the two experiments and excellent linearity was observed ( $R^2 > 0.99$ ) when the cumulative amount released (up to 85%) was plotted against the square root of time.

We needed to confirm that sterilization had no effect on drug stability. Gamma-irradiation was chosen for sterilization due to known or anticipated effects with other methods. For example, filtration of the paclitaxel/C mixture was not possible because of high viscosity and large size of drug particles (200-400  $\mu\text{m}$ ). On the other side, autoclaving would have likely resulted in hydrolysis of the paclitaxel. Also, a previous study revealed that  $\gamma$ -irradiation of chitosan solutions has strong negative effects on the gelling properties of C/GP systems (33). Thus, it was decided to irradiate the paclitaxel alone before incorporation in the sterile chitosan solution. Other authors have investigated the influence of irradiation on paclitaxel release profiles from semi-solid systems and showed minimal effects. The paclitaxel release from a PCL/MePEG paste showed that after 20 days, the release kinetics from both irradiated and non-irradiated samples were not different from each other (18). In the present study, a comparison of the HPLC spectra obtained from irradiated and non-irradiated samples of paclitaxel revealed the absence of degradation, even after 1 or 2 months of storage (Fig. 6.3). This implies that the drug can be sterilized and stored at 4°C until further use. This lack of degradation obviated our need to perform release profiles studies for both irradiated and non-irradiated paclitaxel.

Using EMT-6 murine mammary carcinoma in Balb/c mice, we have demonstrated that the efficacy of the C/GP formulation containing paclitaxel was similar to that of the commercial product Taxol<sup>®</sup> (Fig. 6.4 and 6.5). However, the similarity was between a single local injection of gel containing a dose equivalent to 40 mg/kg compared with 4 systemic injections of Taxol<sup>®</sup> at a dose of 10 mg/kg. Moreover, the animal treated locally with the gel formulation showed no apparent drug-related adverse effects of treatment, whereas the systemic



treatment group showed weight loss during treatment and a few days afterwards (Fig. 6.6). The high local efficacy and low systemic toxicity can be attributed to the slow, continuous and localized release of paclitaxel from the gel. The efficacy of the treatment was demonstrated in two separate studies representing two stages of tumor growth: a) 4 days after inoculation when the tumors were generally very small and not always visually detectable, and b) when the tumors reached a macroscopically observable 30 mm<sup>3</sup> (between day 6 and 9). Other investigators have reported similar results regarding the higher efficacy of local treatments compared to systemic treatments in different cancer models. It was demonstrated that a single intratumoral dose of biodegradable PLA-PEG-PLA thermal gel containing paclitaxel was more effective than a maximum tolerated systemic dose of Taxol<sup>®</sup> against human breast tumor xenografts (MDA231) (22). The intratumoral treatment groups exhibited a dose response that was equal or superior to that of the systemic treatments. Also, the animals treated with the thermal gel intratumorally showed no drug-related adverse effects of treatment, whereas the systemic treatments groups showed weight loss and two instances of acute toxic death within 2 days of dosing. A reduction of  $63 \pm 27\%$  in tumor mass in mice with established and palpable MDA-MB-231 tumors compared with controls through peri-tumoral injection of paclitaxel-gelatin-PCL paste was also shown (19). In that study there was also no significant effect on the weights of the mice following treatment. Unfortunately, the application of such a paste at the tumor site is not trivial. The tumor site has to be opened under anesthesia and the paste has to be heated to around 60°C to allow extrusion to the tumor site. Positive local drug delivery results were demonstrated using a blend of p(DLLA-co-CL)-PEG-p(DLLA-co-CL) with MePEG containing paclitaxel (21). This formulation was a viscous liquid or paste at room temperature that sets into a solid implant within 1 h. A single intratumoral injection used against human prostate LNCaP tumors established in Balb/c mice caused complete regression of the tumors which became non palpable within 2-4 weeks after treatment. Using a similar base material as our chitosan, Nsereko *et al.* (24) used chitin or chitin-Pluronic F-108 microparticles to deliver paclitaxel in a murine model of Lewis lung carcinoma. Control and paclitaxel-containing chitin microparticles were administered subcutaneously at the base of the tumor. The average tumor volume

doubling time increased from 4.70 days in control group to 12.05 days in paclitaxel-containing chitin-Pluronic F-108 microparticles-treated group. However, beyond 8 days, tumor volumes increased in all cases.

Interestingly, our *in vivo* data revealed the injection of C/GP gel can impact the growth of tumors in the absence of drug. In fact, when the C/GP formulation was administered intratumorally into 30 mm<sup>3</sup>-tumors (6-9 days after inoculation), the growth was decreased to a similar extent as the tumors treated with C/GP/paclitaxel (Fig. 6.4), and the histology yielded similar observations. But the susceptibility of the tumors to treatment appeared to have a dependence on time of administration, since a pronounced effect of the C/GP without drug was not observed when the tumors were treated at an earlier stage of development (Fig. 6.5). Insight into this difference comes from others who report anti-tumor characteristics of both chitosan and its derivatives, as well as individual polysaccharides. It appears that the mode by which chitosan imparts this inhibitory activity may be through both direct and indirect manners, although the sequelae which leads to the eventual disruption and inhibition of tumor growth is not known. It is clear that whether through direct or indirect actions, intratumoral injection of chitosan of differing forms has the ability to diminish tumor growth.

Direct exposure to chitosan which demonstrated growth inhibitory characteristics has been reported for different types of tumor cells. Authors have suggested an effect mediated through either the induction of apoptosis, shown on both bladder tumor cells (34) and HL-60 (leukemia) cells (35), or a decrease in glycolysis, for instance in Ehrlich ascites tumor cells (36). More indirect anti-tumor influences can clearly be attributed to chitosan effects on other immune or inflammatory cell types. It has long been understood that chitosan mediates neutrophil, lymphocyte and macrophage responses in migration, cytokine release and cell signaling (37-40) as well as activation of other cell types like fibroblasts, leading to increased production of cytokines (41). Furthermore, it has been shown that BST-Gels<sup>TM</sup> containing chitosans of differing chemistries elicit differential

macrophage responses with regards to adhesion, proliferation and cytokine production (Biosyntech, personal communication). In this study, the injection of C/GP or drug containing C/GP likely promoted the migration of inflammatory cells, the activity of which influenced both vascular permeability and/or paracrine signaling.

Intratumoral administration of chitosan compounds alone has previously been shown to promote antitumoral effects in metastatic breast cancer models; the tumor responses were augmented when those compounds were used in combinations with other therapies including drugs or laser immunotherapy (42). Chitosan was also found to activate macrophages into cytotoxic macrophages *in vivo*, and suppressed Meth-A tumor growth in Balb/c mice (43). Tokoro *et al.* (44) showed that two oligosaccharides consisting solely of the two units which compose chitosan, *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine, were growth-inhibitory to Meth-A solid tumor transplanted in Balb/c mice when administered systemically. It was proposed that increased sequential production of lymphokines IL-1 and IL-2, led to the manifestation of antitumor effect through proliferation of cytolytic T-lymphocytes. Either scenario appears reasonable, and in this study, we observed a significant influx of macrophages and other leukocytes which support possible roles by both cell types. However, the mechanism by which chitosan is able to infer anti-tumor activities through injection is not clear, and it still remains to be shown whether it is a specific immunological response or simply a result of general inflammation.

Chitosan is not unique as a polysaccharide in its inhibitory effect. Chihara *et al.* (45) found that certain polysaccharides isolated from an edible mushroom had *in vivo* antitumor activity against sarcoma 180. Likewise, maitake mushroom polysaccharide extracts activated lymphocyte and macrophage responses and demonstrated *in vivo* anti-tumor effects (46).

Relevant to our study, however, was the Seljelid report that systemic polysaccharide treatment with the water-soluble aminated  $\beta$ 1-3D-glucan (AG) caused total regression of Meth A sarcoma grown intradermally in CB6 mice. (47). The key to successful results was the timing of AG administration. In fact, the effect of AG on tumor growth was clearly dependent on the time point at which the substance was administered. A biphasic response was demonstrated when AG was given IV: a dosing at day 3 after tumor inoculation produced incomplete regression, but equal administration at day 7 led to complete regression in all cases, and yet a 14-day administration yielded no significant effect on tumor growth. Further studies (48) demonstrated intratumoral cytokine profiles correlated to tumor susceptibility. This suggests that our observation of differing responses following inoculation at different stages may be related to the susceptibility state of tumors and the cytokine profiles resulting from cellular responses to the C/GP material. Our histological observations demonstrating an increased inflammatory cell population in tumors treated with C/GP material also suggest that the mechanisms through which C/GP drug delivery operate may have underlying differences from the systemic treatment, albeit with similar outcomes. More studies will be pursued to understand time-dependent susceptibility of tumors with regards to both tumor tissue changes and differential responses to our chitosan-based material.

## 6.6 Conclusion

In summary, we have provided proof of principle and preclinical efficacy data for a site-directed, injectable, and controlled-release formulation of paclitaxel as an effective treatment for localized solid tumors. *In vitro* release profiles demonstrated controlled delivery over 1 month. Local delivery of paclitaxel from the formulation injected intratumorally in EMT-6 tumors implanted subcutaneously on Balb/c mice showed that 1 intratumoral injection of the thermosensitive hydrogel containing paclitaxel was as efficacious as 4 intravenous injections of Taxol<sup>®</sup> in inhibiting the growth of cancer cells, but in a less toxic manner. After 17 days of observation, the C/GP hydrogel containing 64 mg/mL of paclitaxel had released 32% of its drug load *in vitro* and the animals that received this formulation intratumorally displayed a marked tumor growth inhibition. With this information in mind, we can expect a better antitumor efficacy if the rates of dissolution and release of paclitaxel were increased. In order to achieve that, a coprecipitate of paclitaxel and a water-soluble polymer could be prepared and incorporated in the C/GP solution. Histological analysis revealed that although the proportion of necrotic areas was similar for the C/GP/paclitaxel and the Taxol<sup>®</sup>-treated tumors, the difference between tumor-associated inflammatory cell populations may imply differing antitumor mechanisms.

## Acknowledgements

This study was supported in part by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canada Research Chair Program. J.C. Leroux acknowledges a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## 6.7 References

1. S.B. Horwiz, Mechanism of action of taxol, *Trends Pharmacol. Sci.* 13 (1992) 134-136.
2. N. Onetto, R. Canetta, B. Winograd, R. Catane, M. Dougan, J. Grechko, J. Burroughs, M. Rozenzweig, Overview of taxol safety, *Monogr. Natl. Cancer Inst.* 15 (1993) 131-139.
3. E.K. Rowinsky, E.A. Eisenhauer, V. Chaudhry, S.G. Arbuck, R.C. Donehower, Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol), *Semin. Oncol.* 20 (Suppl 3) (1993) 1-15.
4. R.T. Dorr, Pharmacology and toxicology of cremophor diluent, *Ann. Pharmacother.* 28 (1994) S11-S14.
5. P. Kan, Z.B. Chen, C.J. Lee, I.M. Chu, Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system, *J. Controlled Release.* 58 (1999) 271-278.
6. P.P. Constantinides, K.J. Lambert, A.K. Tustian, B. Schneider, S. Lalji, W. Ma, B. Wentzel, D. Kessler, D. Worah, S.C. Quay, Formulation development and antitumor activity of a filter-sterilizable emulsion of paclitaxel, *Pharm. Res.* 17 (2000) 175-182.
7. L. He, G.L. Wang, Q. Zhang, An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile, *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 45-50.
8. E. Harper, W. Dang, R.G. Lapidus, R.I. Garver, Enhanced efficacy of a novel controlled release paclitaxel formulation (PACLIMER delivery system) for local-regional therapy of lung cancer tumor nodules in mice, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 4242-4248.
9. L. Mu, S.S. Feng, Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers, *J. Controlled Release.* 76 (2001) 239-254.
10. M. Ceruti, P. Crosasso, P. Brusa, S. Arpicco, F. Dosio, L. Cattel, Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes

containing water-soluble prodrugs of paclitaxel, *J. Controlled Release*. 63 (2000) 141-153.

11. P. Crosasso, M. Ceruti, P. Brusa, S. Arpicco, F. Dosio, L. Cattel, Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes, *J. Controlled Release*. 63 (2000) 19-30.

12. N.V. Koshina, J.C. Waldrep, L.E. Roberts, E. Golunski, S. Melton, V. Knight, Paclitaxel liposome aerosol treatment induces inhibition of pulmonary metastases in murine renal carcinoma model, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 3258-3262.

13. S.Y. Kim, Y.M. Lee, Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers, *Biomaterials*. 22 (2001) 1697-1704.

14. L. Mu, S.S. Feng, A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS, *J. Controlled Release*. 86 (2003) 33-48.

15. A. Miwa, A. Ishibe, M. Nakano, T. Yamahira, S. Itai, S. Jinno, H. Kawahara, Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1844-1850.

16. S.C. Kim, D.W. Kim, Y.H. Shim, J.S. Bang, H.S. Oh, S.W. Kim, M.H. Seo, In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy, *J. Controlled Release*. 72 (2001) 191-202.

17. J.P. Smith, E. Stock, E.K. Orenberg, N.Y. Yu, S. Kanekal, D.M. Brown, Intratumoral chemotherapy with a sustained-release drug delivery system inhibits growth of human pancreatic cancer xenografts, *Anticancer Drugs*. 6 (1995) 717-726.

18. C.I. Winternitz, J.K. Jackson, A.M. Oktaba, H.M. Burt, Development of a polymeric surgical paste formulation for taxol, *Pharm. Res.* 13 (1996) 368-375.

19. S.K. Dordunoo, A.M.C. Oktaba, W. Hunter, W. Min, T. Cruz, H.M. Burt, Release of taxol from poly( $\epsilon$ -caprolactone) pastes: effect of water-soluble additives, *J. Controlled Release*. 44 (1997) 87-94.

20. E.S. Park, M. Maniar, J.C. Shah, Biodegradable polyanhydride devices of cefazolin sodium, bupivacaine, and taxol for local drug delivery: preparation, and

kinetics and mechanism of in vitro release, *J. Controlled Release*. 52 (1998) 179-189.

21. J.K. Jackson, M.E. Gleave, V. Yago, E. Beraldi, W.L. Hunter, H.M. Burt, The suppression of human prostate tumor growth in mice by the intratumoral injection of a slow-release polymeric paste formulation of paclitaxel, *Cancer Res.* 60 (2000) 4146-4151.

22. G.M. Zentner, R. Rathi, C. Shih, J.C. McRea, M.H. Seo, H. Oh, B.G. Rhee, J. Mestecky, Z. Moldoveanu, M. Morgan, S. Weitman, Biodegradable block copolymers for drug delivery of proteins and water-insoluble drugs, *J. Controlled Release*. 72 (2001) 203-215.

23. W. Vogelhuber, T. Spruß, G. Bernhardt, A. Buschauer, A. Gopferich, Efficacy of BCNU and paclitaxel loaded subcutaneous implants in the interstitial chemotherapy of U-87 MG human glioblastoma xenografts, *Int. J. Pharm.* 238 (2002) 111-121.

24. S. Nsereko, M. Amiji, Localized delivery of paclitaxel in solid tumor from biodegradable chitin microparticle formulations, *Biomaterials*. 23 (2002) 2723-2731.

25. A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M.D. Buschmann, C.D. Hoemann, J.C. Leroux, B.L. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials*. 21 (2000) 2155-2161.

26. A. Chenite, M. Buschmann, D. Wang, C. Chaput, N. Kandani, Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions, *Carbohydr. Polymers*. 46 (2001) 39-47.

27. E. Ruel-Gariépy, A. Chenite, C. Chaput, S. Guirguis, J.-C. Leroux, Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs, *Int. J. Pharm.* 203 (2000) 89-98.

28. C. Jarry, C. Chaput, A. Chenite, M.A. Renaud, M. Buschmann, J.C. Leroux, Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*. 58 (2001) 127-135.

29. A. Sharma, W.D. Conway, R.M. Straubinger, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of taxol in mouse plasma, *J. Chromatogr. B*. 655 (1994) 315-319.



30. A. Hagiwara, T. Takahashi, K. Sawai, C. Sakakura, M. Shirasu, M. Ohgaki, T. Imanishi, J. Yamasaki, Y. Takemoto, N. Kageyama, Selective drug delivery to peri-tumoral region and regional lymphatics by local injection of aclarubicin adsorbed on activated carbon particles in patients with breast cancer - pilot study, *Anticancer Drugs*. 8 (1997) 666-670.
31. T. Higuchi, Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension, *J. Pharm. Sci.* 50 (1961) 874-875.
32. T. Higuchi, Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 1145-1149.
33. C. Jarry, J.C. Leroux, J. Haeck, C. Chaput, Irradiating or autoclaving chitosan/polyol solutions: Effect on thermogelling chitosan- $\beta$ -glycerophosphate systems, *Chem. Pharm. Bull.* 50 (2002) 1335-1340.
34. M. Hasegawa, K. Yagi, S. Iwakawa, M. Hirai, Chitosan induces apoptosis via caspase-3 activation in bladder tumor cells, *Jpn. J. Cancer Res.* 92 (2001) 459-466.
35. H.O. Pae, W.G. Seo, N.Y. Kim, G.S. Oh, G.E. Kim, Y.H. Kim, H.J. Kwak, Y.G. Yun, C.D. Jun, H.T. Chung, Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomers, *Leukoc. Res.* 25 (2001) 339-346.
36. M. Guminska, J. Ignacak, E. Wojcik, In vitro inhibitory effect of chitosan and its degradation products on energy metabolism in Ehrlich ascites tumour cells (EAT), *Pol. J. Pharmacol.* 48 (1996) 495-501.
37. R.A.A. Muzzarelli, G. Biagini, Role and fate of exogenous chitosans in human wound tissue, in: R.A.A. Muzzarelli (Ed.), *Chitin*, Eur. Chitin Soc., Ancona, 1993, p. 187-196.
38. Y. Shigemasa, S. Minami, Applications of chitin and chitosan for biomaterials, *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 13 (1995) 383-420.
39. G. Peluso, O. Petillo, M. Ranieri, M. Santin, L. Ambrosio, D. Calabro, B. Avallone, G. Balsamo, Chitosan-mediated stimulation of macrophage function, *Biomaterials*. 15 (1994) 1215-1220.
40. Y. Usami, Y. Okamoto, S. Minami, A. Matsushashi, N. Kumazawa, S. Tanioka, Y. Shigemasa, Chitin and chitosan induce migration of bovine polymorphonuclear cells, *J. Vet. Med. Sci.* 56 (1994) 761-762.

41. T. Mori, M. Okumura, M. Matsuura, K. Ueno, S. Tokura, Y. Okamoto, S. Minami, T. Fujinaga, Effects of chitin and its derivative on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro, *Biomaterials*. 18 (1997) 947-951.
42. W.R. Chen, R.L. Adams, R. Carubelli, R.E. Nordquist, Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment, *Cancer Lett.* 115 (1997) 25-30.
43. K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura, I. Azuma, Immunological activity of chitin and its derivatives, *Vaccine*. 2 (1984) 93-98.
44. A. Tokoro, N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, M. Suzuki, Growth-inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.* 36 (1988) 784-790.
45. G. Chihara, Y. Maeda, J. Hamuro, T. Sasaki, F. Fukuoka, Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *lentinus edodes* (Berk.) sing, *Nature*. 222 (1969) 687-688.
46. N. Kodama, N. Harada, H. Nanba, A polysaccharide, extract from *Grifola frondosa*, induces Th-1 dominant responses in carcinoma-bearing BALB/c mice, *Jpn. J. Pharmacol.* 90 (2002) 357-360.
47. R. Seljelid, A water-soluble aminated B1-3D-glucan derivative causes regression of solid tumors in mice, *Biosci. Rep.* 6 (1986) 845-851.
48. R. Seljelid, Y. Figenschau, J. Bogwald, L.T. Rasmussen, R. Autgulen, Evidence that tumour necrosis induced by aminated B1-3D polyglucose is mediated by a concerted action of local and systemic cytokines, *Scand. J. Immunol.* 30 (1989) 687-694.

## **CHAPITRE 7**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

## 7 Discussion générale

Le principal but de ce projet était de caractériser un nouveau système thermosensible à base de chitosan et d'étudier le potentiel de ce dernier en tant que véhicule pour la libération prolongée de médicaments.

### 7.1 Caractérisation du système thermosensible

#### 7.1.1 Cinétique de gélification

Un système auto-formant *in situ* thermosensible destiné à l'administration parentérale de médicaments doit former un implant rapidement à 37°C afin de limiter la libération initiale de principe actif et l'étalement de la solution au site d'injection. La cinétique de gélification à 37°C de la solution thermosensible à base de chitosan a donc été évaluée à l'aide d'un rhéomètre (voir 1.5.4). Les données obtenues montrent que la solution de chitosan et de glycérophosphate (C/GP) gélifie rapidement (5-140 min) et que la vitesse de gélification dépend du degré de désacétylation du chitosan utilisé (Fig. 3.1). En effet, une augmentation du degré de désacétylation (95% vs 84%) accélère la vitesse de gélification. Cette différence peut être attribuée à l'augmentation de la densité des liens entre les groupements ammonium du chitosan et les groupements phosphate du glycérophosphate (GP) favorisant le rapprochement des chaînes de chitosan.

La libération des composés hydrophiles de petite taille à partir du gel de chitosan est habituellement complète après ~ 24 h (Fig. 3.3 et 3.5, discuté au point 7.2.1.2). Afin de ralentir leur libération, nous avons décidé de les

encapsuler dans des liposomes avant de les incorporer dans la solution thermosensible. Avant de procéder aux études de libération *in vitro*, nous avons déterminé l'influence de la présence des liposomes dans la solution thermosensible sur sa cinétique de gélification à 37°C. L'ajout des liposomes n'a pas d'impact négatif sur ce processus. Leur présence accélère légèrement la vitesse de gélification et permet l'obtention de gels plus solides (module élastique plus élevé) (Fig. 4.2). Il est probable que des interactions hydrophobes entre les liposomes et le chitosan facilitent le rapprochement des chaînes de chitosan, ce qui aide la formation du gel et améliore sa solidité. En effet, Onsoyen (1) a rapporté que les interactions entre le chitosan et les liposomes à base de phosphatidylcholine sont majoritairement de nature hydrophobe.

### 7.1.2 Stabilité de la solution

Un système auto-formant *in situ* thermosensible doit être stable à température ambiante suffisamment longtemps pour permettre l'injection. Il ne doit pas y avoir de contrainte de temps pour le manipulateur. La stabilité de deux solutions C/GP a été évaluée à 4°C ainsi qu'à température ambiante. La viscosité ainsi que la cinétique de gélification à 37°C ont été mesurées à différents temps après la préparation (voir 1.5.5). La solution à base de chitosan désacétylé à 84% (C84) demeure liquide au moins 2 mois à température ambiante et au moins 3 mois à 4°C (Fig. 3.2). L'utilisation d'un chitosan désacétylé à 95% (C95) diminue la stabilité de la préparation. La solution à base d'un mélange 1:1 de C84 et de C95 est liquide pendant 3 jours à 4°C mais gélifie en moins d'une semaine. Conservée à température ambiante, cette dernière gélifie en moins de 24 heures. Ces observations indiquent que les forces de répulsion stabilisant le système à basse température ( $\leq$  température ambiante) sont plus importantes lorsque le degré de désacétylation du chitosan diminue (84 vs 95%). Au chapitre 3, nous avons émis l'hypothèse que la solution C/GP demeurerait liquide à basse température à cause de l'effet stabilisateur du GP, un polyol. Ces composés favorisent la formation d'une couche d'eau autour des macromolécules telles que

les protéines (2-4). Il est probable que la stabilité de la solution C/GP diminue lorsque le degré de désacétylation augmente parce que la densité des liens entre les groupements phosphate du GP et les groupements ammonium du chitosan limite l'hydratation des chaînes de chitosan.

### 7.1.3 Érosion du gel

La libération d'un composé à partir d'une forme dépôt peut se faire par diffusion de la molécule à travers la matrice ou suite à l'érosion de celle-ci. L'ampleur du phénomène d'érosion après gélification de la solution thermosensible a été déterminée dans des conditions identiques à celles utilisées lors des études de libération *in vitro* (cellule de libération, flux continu de PBS 10 mL/h, 37°C) (voir 1.5.7). Ces résultats combinés à ceux des études de libération permettent de déterminer le mécanisme principal de libération des molécules à partir du gel. Ce point sera discuté dans la section 7.2.1.5. Les données recueillies montrent que l'érosion du gel à 37°C a lieu surtout au cours des 4 premières heures suivant sa formation et qu'elle est similaire pour le gel à base de C84 et celui à base du mélange 1:1 C84:C95 (Fig. 3.7). Ces résultats suggèrent que malgré une cinétique de gélification différente (Fig. 3.1), les gels formés à partir des différentes solutions de chitosan et de GP ont une structure finale similaire. On remarque également que 71% de la masse solide initiale (chitosan et GP) sont perdus après 4 heures (Fig. 3.7 médaillon). La masse solide étant composée à 20% de chitosan et à 80% de GP, on peut supposer qu'une grande partie du GP ne contribue pas au maintien de la structure et qu'il diffuse hors du gel après sa formation. De 4 à 24 heures, la masse de gel est stable, ce qui indique que sa structure n'évolue pas significativement durant cette période.

#### 7.1.4 Microscopie électronique à balayage

Les gels sont des systèmes poreux et la taille des pores peut influencer la libération des molécules incorporées. La microscopie électronique à balayage a été employée afin de déterminer la taille des pores du gel (voir 1.5.8). Ces images ont été acquises sur des échantillons ayant été soumis à des conditions similaires à celles utilisées lors des études de libération *in vitro*. Les photographies montrent que la taille des pores varie entre 5 et 10  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.8) et que la structure du gel est identique pour les deux solutions C/GP testées, soit celle à base de C84 et celle à base de C84:C95 (résultats non présentés). Ces résultats corroborent ceux des études d'érosion en ce qui concerne la structure des gels: celle-ci est identique pour les deux chitosans utilisés. La grande taille des pores du gel comparativement à la taille des molécules incorporées ( $\leq 148\,000\text{ Da}$ ) explique la libération rapide de ces dernières (Fig. 3.3, 3.4 et 3.5).

Cette technique d'imagerie a également été utilisée pour vérifier que les liposomes préservent leur intégrité suite à leur incorporation dans la solution thermosensible et à sa gélification (chapitre 4). Ces photographies ont été effectuées sur des échantillons non soumis aux conditions de libération *in vitro*. Le mélange liposome/solution thermosensible a été gélifié dans un incubateur à 37°C. L'imagerie après cryofracture permet de constater que les liposomes sont stables lors de l'incorporation dans la solution thermosensible et suite à la gélification de celle-ci (Fig. 4.4).

## 7.2 Études de libération *in vitro*

### 7.2.1 Libération de composés hydrophiles

#### 7.2.1.1 Influence de la présence de glycérophosphate (GP)

Les chitosans ayant un degré de désacétylation de  $\sim 85\%$  ne sont solubles que lorsque le pH est inférieur à  $\sim 6.2$  (5). Le tampon de libération ayant un pH de 7.4, il y a formation d'un précipité hydraté (semblable à un gel) lorsque la solution de chitosan est placée dans les cellules de libération. Ce précipité peut servir de forme dépôt (système auto-formant *in situ* pH-sensible). Afin de déterminer l'avantage de la solution thermosensible (C/GP) par rapport au système pH-sensible pour la libération prolongée de molécules, des études de libération de la chlorphéniramine ont été entreprises. La présence de GP dans la solution de chitosan permet de diminuer significativement la libération initiale du principe actif (Fig. 3.3). Après 4 h, elle est de 53% en absence de GP et 15% en sa présence. Ces données suggèrent que la précipitation de la solution de chitosan en fonction du pH est un phénomène plus lent que la gélification de la solution thermosensible à  $37^{\circ}\text{C}$  ou qu'elle entraîne la formation d'un gel plus faible retenant moins la molécule incorporée. Ces résultats montrent que la solution thermosensible est donc intéressante pour la mise au point d'un système de libération prolongée de médicaments.

#### 7.2.1.2 Influence de la taille de composés incorporés

Plusieurs études de libérations *in vitro* ont été entreprises pour déterminer l'influence de la taille des molécules hydrophiles incorporées sur leur libération à partir du gel. Nos résultats montrent que la taille des molécules gouverne leur vitesse de libération. On peut distinguer deux grandes classes: les composés ayant



un poids moléculaire inférieur à 1000 Da et ceux ayant un poids moléculaire supérieur à 1000 Da. La libération des macromolécules ( $> 1000$  Da) s'étend sur une période de quelques jours (Fig. 3.4) alors que celle des petits composés ne dure que  $\sim 24$  h (Fig. 3.3 et 3.5). La libération rapide des composés hydrophiles est attribuable aux caractéristiques du gel, majoritairement composé d'eau et très poreux (Fig. 3.8). La différence de vitesse de libération en fonction de la taille des molécules découle du fait que, dans un solvant donné, le coefficient de diffusion ( $D$ ) diminue lorsque la taille de la molécule diffusante augmente (6). Dans l'eau, par exemple,  $D$  est de l'ordre de  $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  pour des solutés ayant une masse molaire  $\sim 50$  Da et il diminue à  $\sim 1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  lorsque la masse molaire augmente à quelques milliers Da.

Les résultats obtenus avec l'hexaréline ne respectent pas la logique énoncée ci-haut. L'hexaréline est un peptide de 6 acides aminés ayant une masse molaire de 887 Da. Sa libération devrait atteindre 100% après  $\sim 24$  h. Cependant, seulement 18% de l'hexaréline incorporée dans le gel est récupérée après 24 h et 21% après 48 h (Fig. 5.3). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que l'hexaréline a tendance à s'adsorber sur le verre, le matériau utilisé pour la fabrication des cellules de libération. Il est donc possible qu'une proportion de la quantité libérée n'ait pas été dosée puisque la molécule était immobilisée par adsorption dans les cellules de verre et n'a pas été entraînée vers les tubes collecteurs par le tampon de libération.

### 7.2.1.3 Influence du degré de désacétylation du chitosan utilisé

Les études de rhéologie ont révélé que les solutions à base de C84 et celles à base du mélange 1:1 C84:C95 avaient une cinétique de gélification très différente à  $37^\circ\text{C}$  (Fig. 3.1). Des études de libération *in vitro* ont donc été effectuées afin de déterminer si cette différence influençait la cinétique de libération d'une molécule donnée. Les profils de libération de dextran 40 000

(0.06%) sont semblables pour les deux solutions thermosensibles (résultats non montrés). Ces données de libération indiquent, tout comme celles d'érosion (Fig. 3.7) et d'imagerie électronique, que les gels sont semblables quel que soit le chitosan utilisé pour la préparation de la solution.

#### 7.2.1.4 Influence de la charge du composé incorporé

La solution thermosensible originale (chapitre 3) contient 7.3% de GP et 1.8% de chitosan. Le GP possède une charge négative alors que le chitosan en solution est cationique. Nous avons déterminé que la préparation finale contient des charges résiduelles négatives non complexées puisqu'il y a 2.6 moles de  $\text{PO}_4^{2-}$  (GP) par mole de  $\text{NH}_3^+$  (chitosan). Des études de libération avec des composés chargés ont été réalisées afin d'évaluer l'effet de la charge du gel sur la libération de ces molécules. Les résultats montrent que la présence de charges résiduelles négatives dans le gel n'influence pas la libération de composés chargés lorsque leur concentration est faible ( $< 0.2\%$ ). En effet, les profils de libération sont similaires, que la molécule soit chargée positivement (bleu de méthylène) ou négativement (calcéine) (Fig. 3.5). Toutefois, un composé anionique, présent en concentration suffisante, peut déplacer le GP et se lier au chitosan par l'intermédiaire des groupements ammonium. Ce phénomène est illustré à la figure 3.6 où la libération d'albumine (chargé négativement à pH 7.4, concentration 3%) atteint un plateau ( $\sim 50\%$ ) après 3 jours. Ceci suggère qu'une partie de l'albumine est liée au réseau de polymère. L'ajout de lysozyme, une enzyme dégradant le chitosan, au tampon de libération a un effet limité sur la libération de l'albumine liée puisque le chitosan utilisé est peu susceptible à l'action de cette enzyme (7).

### **7.2.1.5 Mécanisme de libération des composés hydrophiles**

La comparaison des résultats des études d'érosion et de libération *in vitro* permet de constater que la libération des composés hydrophiles a lieu principalement par diffusion. En effet, les cinétiques de libération sont très différentes de la cinétique d'érosion des gels. Nous avons constaté qu'après 4 heures, le gel a perdu ~ 40 % de sa masse totale initiale (Fig. 3.7) alors que la libération des composés incorporés ne dépasse pas 20% à ce stade (Fig. 3.3, 3.4 et 3.5).

### **7.2.2 Libération d'un composé hydrophile encapsulé dans des liposomes avant incorporation dans la solution thermosensible**

Tel que mentionné au point 7.2.1.2, la libération des petites molécules hydrophiles (< 1000 Da) dissoutes dans le gel se limite à ~ 24 h. Afin de ralentir leur diffusion hors du gel, nous avons envisagé de les encapsuler dans des liposomes (voir 1.5.3) avant incorporation dans la solution thermosensible. Cette stratégie a été utilisée avec succès par plusieurs auteurs pour prolonger la période de libération de composés tels que des oligonucléotides et des agents anti-infectieux (ciprofloxacine, foscarnet) (8-13). Pour vérifier notre hypothèse, la carboxyfluorescéine (CF) a été choisie comme substance modèle. Cette molécule est hydrophile, a une masse molaire de 376 Da et a la propriété d'absorber sa propre fluorescence lorsque sa concentration est supérieure à 10 mM (14). Cette caractéristique permet de distinguer les molécules encapsulées dans les liposomes des molécules libres dans le milieu de libération. En effet, la CF encapsulée dans les liposomes émet peu de fluorescence car sa concentration est élevée alors que la CF libre a une fluorescence importante car elle est diluée dans le milieu environnant (voir 1.5.6).

### 7.2.2.1 Influence des liposomes

L'utilisation des liposomes permet de ralentir significativement la libération de la CF. Lorsqu'elle est dissoute dans la solution thermosensible, la libération est complète en ~ 24 h (Fig. 4.3). Par contre, son encapsulation dans des liposomes avant incorporation dans la solution thermosensible permet une libération pendant au moins 2 semaines (Fig. 4.3, 4.5 à 4.8). La membrane des liposomes constitue une barrière supplémentaire que la molécule doit franchir avant d'être libérée du gel.

Sachant que l'utilisation des liposomes était une méthode appropriée pour ralentir la libération des petits composés hydrophiles, nous avons entrepris de déterminer quelles caractéristiques des liposomes influençaient le profil de libération et dans quelle mesure. Pour cela, nous avons effectué plusieurs études de libération de la CF où la taille des liposomes, leur lamellarité ou leur composition étaient variées.

### 7.2.2.2 Influence de la taille des liposomes

Des liposomes de composition identique (phosphatidylcholine d'œuf et cholestérol, EPC/Chol) mais de taille différente ont été utilisés (Tableau 4.1, préparation 2 et 3). La taille des liposomes influence la libération de la CF. La libération initiale ainsi que la vitesse de libération diminue significativement lorsque la taille des liposomes passe de 100 à 280 nm (Fig. 4.3). Cet effet est attribuable premièrement à la variation du coefficient de diffusion des liposomes en fonction de leur taille. En effet, selon l'équation de Stokes-Einstein, la vitesse de diffusion des colloïdes est inversement proportionnelle à leur diamètre hydrodynamique (15). Les liposomes de 280 nm diffusent donc plus lentement hors du gel que ceux de 100 nm, entraînant une diminution de la quantité de CF encapsulée présente dans le milieu de libération à un temps donné.

Deuxièmement, la libération de CF à partir des liposomes est influencée par la taille de ceux-ci. Dans le modèle mathématique que nous avons développé pour caractériser la libération à partir du système liposome/solution thermosensible, la vitesse de diffusion de la CF hors des liposomes, pendant que ceux-ci sont encore à l'intérieur du gel, est exprimée par la constante  $K_{12}$  (Fig. 4.1). Or, la valeur de  $K_{12}$  diminue lorsque la taille des liposomes augmente ( $1.56 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  et  $0.13 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  pour les liposomes de 103 nm et 281 nm, respectivement) (Tableau 4.1).

### 7.2.2.3 Influence de la lamellarité des liposomes

Les liposomes peuvent être composés d'une seule bicouche de lipides (unilamellaire) ou de plusieurs (multilamellaire). La technique utilisée pour préparer les liposomes employés dans les différentes études de libération entraîne généralement la formation de liposomes multilamellaires. Par la suite, ceux-ci sont extrudés afin d'obtenir des liposomes unilamellaires de taille uniforme. Dans une expérience de libération, les liposomes utilisés n'ont pas été extrudés (Tableau 4.1, préparation 4). Les résultats de cette étude montrent que l'utilisation de liposomes multilamellaires de grande taille (589 nm) inhibe presque complètement la libération. Seulement 6% de la CF est libérée en 7 jours (Fig. 4.5). Ce résultat peut être expliqué par la faible diffusion de CF hors des liposomes ( $K_{12} = 0.08 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) (Tableau 4.1) et la lente diffusion des liposomes dans le gel.

### 7.2.2.4 Influence de la composition des liposomes

Afin de déterminer l'influence de la composition des liposomes sur la libération de la CF, plusieurs types de lipides ont été employés. Nous avons étudié l'influence de la présence de cholestérol, de la présence d'un lipide chargé négativement (1,2-dimyristol-*sn*-glycéro-3-phosphoglycérol, DMPG) et de la température de transition de la phosphatidylcholine utilisée (EPC vs 1,2-

distéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine, DSPC) sur le profil de libération de la CF.

La présence de Chol dans les liposomes a un effet marqué sur le profil de libération de la CF. L'ajout de Chol aux liposomes de EPC ralentit la libération initiale (27 vs 47%) de CF (Fig. 4.6). De plus, 60-70% de la CF est encore encapsulée dans les liposomes EPC/Chol après sa sortie du gel alors que cette proportion n'est que de 6-16% avec les liposomes composés de EPC seulement. Ces résultats découlent du fait que le Chol réduit la perméabilité des liposomes et améliore leur stabilité (16-19).

L'ajout de 6 mol% de DMPG (lipide chargé négativement) aux liposomes EPC/Chol influence peu le profil de libération (Fig. 4.7). Seule une légère augmentation de la libération de CF est observée (78% avec EPC/Chol/DMPG vs 72% avec EPC/Chol). L'absence d'effet du DMPG sur la libération de la CF peut être expliquée par la faible proportion utilisée. Nous avons vu au point 7.2.1.4 que la présence d'une charge négative sur la molécule incorporée n'influence pas le profil de libération tant que la concentration demeure peu élevée (< 0.2%). On peut appliquer ce raisonnement aux liposomes chargés négativement (EPC/Chol/DMPG) puisqu'il s'agit d'une entité dispersée dans le gel de chitosan.

L'utilisation d'un lipide ayant une température de transition de phase plus élevée que EPC (DSPC,  $T_m = 55^\circ\text{C}$ ) entraîne une augmentation modeste de la stabilité des liposomes dans le gel (Fig. 4.8). En effet, la proportion de CF libérée du gel mais encore encapsulée dans les liposomes augmente légèrement, passant de 60-70% (EPC/Chol) à 70-80% (DSPC/Chol). L'augmentation de stabilité est peu prononcée, car la présence d'une proportion importante de Chol (40 mol%) entraîne la formation de membranes ayant des propriétés similaires.

### 7.2.3 Libération d'un composé hydrophobe

La solution thermosensible a aussi été évaluée pour la libération d'un composé pratiquement insoluble dans l'eau, le paclitaxel (voir 1.5.6). Il s'agit d'un agent anti-néoplasique utilisé principalement pour le traitement du cancer du sein et de l'ovaire. Celui-ci a été dispersé dans la solution thermosensible sous forme solide (voir 1.5.2). Nos résultats révèlent que le gel peut soutenir la libération du paclitaxel pendant au moins 1 mois (Fig. 6.2). Ces données montrent que la solubilité d'un composé dans l'eau influence sa libération. Pour être libéré, le paclitaxel doit d'abord se dissoudre dans le gel (dans l'eau) puis diffuser hors de celui-ci. Étant donné sa faible solubilité dans l'eau, c'est le processus de solubilisation qui est le facteur limitant la libération.

Nos résultats montrent également que la vitesse de libération du paclitaxel est inversement proportionnelle à sa concentration dans le gel (Fig. 6.2). Une augmentation de la concentration de paclitaxel dispersé dans le gel (64 vs 6.4 mg/mL) entraîne une diminution du pourcentage libéré pour un temps donné. Ces résultats découlent également du fait que le paclitaxel doit se solubiliser dans le gel avant d'être libéré. La quantité de principe actif dissoute, qui est limitée, représente un pourcentage plus faible lorsque la quantité totale augmente. Pour ce qui est de la quantité (mg) de paclitaxel libérée pour un temps donné, elle augmente lorsque la concentration totale présente dans le gel est plus élevée. On peut relier la quantité libérée en fonction du temps et la concentration présente dans la matrice à l'aide de l'équation développée par Higuchi (20, 21) (Équation 6.1). Selon cette relation, les quantités libérées varient en fonction de la racine carrée de la concentration présente dans la matrice. Les résultats obtenus répondent à cette loi. La différence d'un facteur 10 entre les concentrations utilisées (64 et 6.4 mg/mL) entraîne une variation d'un coefficient 3.0 à 3.9 ( $\sqrt{10} = 3.2$ ) entre les quantités libérées. Ainsi, après 2 jours, 1.5 mg de paclitaxel ont été libérés du gel contenant 64 mg/mL de paclitaxel alors que 0.5 mg ont été libérés du gel contenant 6,4 mg/mL.

### 7.3 Étude *in vivo* avec l'hexaréline

L'hexaréline est un sécrétagogue de l'hormone de croissance. Elle a été choisie comme modèle pour les essais *in vivo* avec le système liposomes/solution thermosensible étant donné qu'une méthode de dosage dans le plasma de rat était au point et que l'effet pharmacologique de cette molécule est facile à évaluer.

La préparation des liposomes contenant de l'hexaréline a d'abord été optimisée (voir 5.2.2 et 5.2.3). Ces études révèlent que l'extrusion permet d'obtenir une taille semblable d'un lot à l'autre et une meilleure incorporation du principe actif que l'utilisation de la sonde à ultrasons (Tableau 5.1). Une étude pharmacocinétique a ensuite été effectuée afin d'évaluer le potentiel du système liposome/solution thermosensible pour l'administration prolongée de peptides thérapeutiques (voir 5.2.6). Les résultats indiquent que cette formulation ne permet pas de maintenir des taux plasmatiques détectables d'hexaréline au-delà de 24 h (Fig. 5.4). Roumi *et al.* (26) ont étudié la pharmacocinétique de l'hexaréline chez le rat. Les auteurs ont montré qu'elle est rapidement absorbée suite à une injection sous-cutanée et que la demi-vie est ~ 60 min. Il est donc possible que la formulation liposome/solution thermosensible injectée au niveau sous-cutané ne permette pas de maintenir des taux significatifs d'hexaréline dans le plasma parce que la libération à partir du gel est très faible ce qui entraîne des concentrations plasmatiques à l'équilibre en deçà du seuil de détection de la méthode de dosage.



## 7.4 Études *in vivo* avec le paclitaxel

Étant capable de soutenir la libération de paclitaxel sur plus d'un mois, la solution thermosensible représente une forme pharmaceutique prometteuse pour la chimiothérapie locale. Afin d'évaluer le potentiel de cette formulation pour ce type d'application, la solution thermosensible contenant du paclitaxel a été injectée par la voie intra-tumorale à des souris Balb/c porteuses de tumeurs EMT-6 (carcinome mammaire murin) (voir 1.5.9). Ce nouveau traitement a été comparé au traitement standard actuel, soit l'administration intra-veineuse de Taxol®. L'efficacité du traitement a été mesurée en suivant la croissance tumorale. La nouvelle approche est aussi efficace que le traitement standard pour ralentir la croissance des cellules EMT-6 (Fig. 6.4 et 6.5). De plus, les effets secondaires systémiques diminuent significativement suite à l'injection locale. En effet, les animaux ayant reçu un traitement par la voie intra-veineuse présentent une perte de poids ce qui n'est pas observé suite à l'administration locale (Fig. 6.6). Le traitement local à l'aide de la solution thermosensible est donc intéressant puisqu'il est aussi efficace que le traitement de référence tout en diminuant les effets secondaires. Aussi, il faut mentionner que pour obtenir un effet comparable, le traitement local ne requiert qu'une seule injection alors que le traitement systémique nécessite 4 injections.

Les études *in vivo* révèlent également que la solution thermosensible seule peut diminuer la croissance tumorale. Cet effet n'est toutefois visible que lorsque les tumeurs atteignent 30 mm<sup>2</sup> au moment de l'injection (Fig. 6.4). L'analyse histologique des tissus tumoraux corrobore ces résultats. L'injection intra-tumorale de solution thermosensible (contenant du paclitaxel ou non) entraîne une nécrose des cellules cancéreuses comparable à celle induite par l'injection intra-veineuse de Taxol® (Fig. 6.7). Il a déjà été rapporté que le chitosan exerçait un effet anti-tumoral dans divers modèles animaux de cancer (27-29). Toutefois, l'influence du stade de développement tumoral sur l'efficacité est peu étudiée. Seljelid (30) a montré que l'administration systémique du polysaccharide  $\beta$ 1-3D-

glucan aminé entraîne une régression totale d'un sarcome Meth A implanté chez des souris CB6 si le traitement est administré 7 jours après l'inoculation des cellules tumorales. Cependant, la régression est partielle si le traitement est administré 3 jours après l'inoculation et aucun effet significatif sur la croissance tumorale n'est observé s'il est administré au 14<sup>e</sup> jour. Il est donc possible que les cellules tumorales EMT-6 répondent de façon différente à la présence de la solution thermosensible selon leur stade de croissance.

## 7.5 Bibliographie

1. E. Onsoyen, Chitosan as stabilizer and bioadhesive carrier in liposome formulations, in: C.J. Brine, P.A. Sandford, and J.P. Zikakis (Eds.), *Advances in chitin and chitosan*, Elsevier, London, 1992, p. 479-488.
2. J.F. Back, D. Oakenfull, M.B. Smith, Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Biochemistry*. 18 (1979) 5191-5196.
3. K. Gekko, S.N. Timasheff, Mechanism of protein stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures, *Biochemistry*. 20 (1981) 4667-4676.
4. G.C. Na, S.N. Timasheff, Interaction of calf brain tubulin with glycerol, *J. Mol. Biol.* 151 (1981) 165-178.
5. E.J. Singer, E.P. Pittz, Interaction of surfactants with epidermal tissues: Biochemical and toxicological aspects, in: M.M. Rieger (Eds.), *Surfactants in cosmetics*, Marcel Dekker, New York, 1985, .
6. M. Aulton, Properties of solutions, in: M.E. Aulton (Eds.), *Pharmaceutics. The science of dosage form design*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002, p. 33-40.
7. K. Tomihata, Y. Ikada, In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials*. 18 (1997) 567-575.
8. A.L. Weiner, S.S. Carpenter-Green, E.C. Soehngen, R.P. Lenk, M.C. Popescu, Liposome-collagen gel matrix: a novel sustained drug delivery system, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 922-925.
9. A. Bochot, E. Fattal, A. Gulik, G. Couarraze, P. Couvreur, Liposomes dispersed within a thermosensitive gel: a new dosage form for ocular delivery of oligonucleotides, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1364-1369.
10. V. DiTizio, G.W. Ferguson, M.W. Mittelman, A.E. Khoury, A.W. Bruce, F. DiCosmo, A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters, *Biomaterials*. 19 (1998) 1877-1884.

11. J. Piret, P. Gourde, H. Cormier, A. Désormeaux, D. Beauchamp, M.J. Tremblay, J. Juhasz, M.G. Bergeron, Efficacy of gel formulations containing free and liposomal foscarnet in a murine model of cutaneous HSV-1 infection, *J. Liposome Res.* 9 (1999) 181-198.
12. V. DiTizio, C. Karlgard, L. Lilge, A. Khoury, M.W. Mittelman, F. DiCosmo, Localized drug delivery using crosslinked gelatin gels containing liposomes: Factors influencing liposome stability and drug release, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 96-106.
13. A. Paavola, I. Kilpelainen, J. Yliruusi, P. Rosenberg, Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia, *Int. J. Pharm.* 199 (2000) 85-93.
14. J.N. Weinstein, S. Yoshikami, P. Henkart, R. Blumenthal, W.A. Hagins, Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker, *Science*. 195 (1977) 489-492.
15. Principles of colloid and surface chemistry, ed. J.J. Lagowski. 1986, New York: Marcel Dekker.
16. D. Papahadjopoulos, S. Nir, S. Ohki, Permeability properties of phospholipid membranes: effect of cholesterol and temperature, *Biochim. Biophys. Acta*. 266 (1971) 561-583.
17. J. De Gier, C.V.M. Haest, J.G. Mandersloot, L.L.M. Van Deenen, Valinomycin-induced permeation of  $86\text{Rb}^+$  of liposomes with varying composition through the bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*. 211 (1970) 373-375.
18. D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, T. Isac, Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta*. 311 (1973) 330-348.
19. D. Papahadjopoulos, M. Cowden, H. Kimelberg, Role of cholesterol in membranes effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity, *Biochim. Biophys. Acta*. 330 (1973) 8-26.
20. T. Higuchi, Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension, *J. Pharm. Sci.* 50 (1961) 874-875.

21. T. Higuchi, Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 1145-1149.
22. J.A.N. Zasadzinski, Transmission electron microscopy observations of sonication-induced changes in liposome structure, *Biophys. J.* 49 (1986) 1119-1130.
23. J. Meyer, L. Whitcomb, D. Collins, Efficient encapsulation of proteins within liposomes for slow release in vivo, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 433-438.
24. A. Ariën, C. Goigoux, C. Baquey, B. Dupuy, Study of in vitro and in vivo stability of liposomes loaded with calcitonin or indium in the gastrointestinal tract, *Life Sci.* 53 (1993) 1279-1290.
25. A. Arien, B. Dupuy, Encapsulation of calcitonin in liposomes depends on the vesicle preparation method, *J. Microencapsulation.* 14 (1997) 753-760.
26. M. Roumi, S. Marleau, P. Du Souich, T. Maggi, R. Deghenghi, H. Ong, Kinetics and disposition of hexarelin, a peptidic growth hormone secretagogue, in rats, *Drug Metab. Dispos.* 28 (2000) 44-50.
27. W.R. Chen, R.L. Adams, R. Carubelli, R.E. Nordquist, Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment, *Cancer Lett.* 115 (1997) 25-30.
28. K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura, I. Azuma, Immunological activity of chitin and its derivatives, *Vaccine.* 2 (1984) 93-98.
29. A. Tokoro, N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki, M. Suzuki, Growth-inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor, *Chem. Pharm. Bull.* 36 (1988) 784-790.
30. R. Seljelid, A water-soluble aminated B1-3D-glucan derivative causes regression of solid tumors in mice, *Biosci. Rep.* 6 (1986) 845-851.

## **CHAPITRE 8**

## **CONCLUSION**

## 8 Conclusion

Plusieurs formes à libération prolongée ont été proposées au cours des dernières décennies. Elles sont très prisées car elles permettent, entre autres, de réduire le nombre de prises de médicaments améliorant ainsi l'observance au traitement. Récemment, une formulation thermosensible à base de chitosan a été développée. Le principal but de ces travaux de doctorat était de caractériser ce nouveau système thermosensible et d'étudier les possibilités d'utilisation de ce dernier en tant que support pour la libération prolongée de médicaments. Les différentes expériences effectuées ont permis de déterminer que:

- la solution thermosensible à base de chitosan forme un gel à la température du corps (37°C)
- la solution thermosensible est stable 2 mois à la température ambiante et trois mois à 4°C
- la solution thermosensible permet la libération de macromolécules hydrophiles sur une période de plusieurs heures à quelques jours
- la libération de petites molécules hydrophiles à partir de la solution thermosensible est complétée en ~24 heures
- la présence de liposomes dans le gel influence peu la cinétique de gélification
- l'utilisation des liposomes dans le gel permet de ralentir considérablement la vitesse de libération des petites molécules hydrophiles
- la cinétique de libération des petites molécules hydrophiles peut être modulée en variant la taille et la composition des liposomes

- l'utilisation de la formulation liposome/solution thermosensible est peu appropriée pour la libération prolongée de peptides thérapeutiques
- la solution thermosensible permet la libération d'un composé hydrophobe (paclitaxel) sur une période prolongée (> 1 mois)
- la solution thermosensible contenant du paclitaxel est aussi efficace que la formulation présentement disponible sur le marché (Taxol<sup>®</sup>) pour ralentir la croissance de tumeurs EMT-6 chez la souris lorsqu'elle est injectée par la voie intra-tumorale
- l'administration intra-tumorale de la solution thermosensible contenant du paclitaxel entraîne une toxicité systémique moins importante que l'administration intra-veineuse du Taxol<sup>®</sup>

En résumé, ces travaux ont permis de mieux cerner le potentiel de la solution thermosensible à base de chitosan en tant que véhicule de médicaments.

D'autres applications locales pourraient maintenant être envisagées. Particulièrement, la régénération tissulaire. En effet, un groupe de chercheurs de l'École Polytechnique de Montréal étudie présentement la possibilité d'utiliser la solution thermosensible pour la régénération du cartilage. Ce traitement serait destiné aux patients atteints d'arthrose. L'injection de la solution à base de chitosan au niveau de défauts dans le cartilage donnent des résultats intéressants. La préparation permet la formation de nouveaux tissus. L'étape suivante serait d'incorporer des facteurs de croissance, par exemple, dans la préparation et de vérifier si leur libération à partir du gel permet d'améliorer le traitement.



